

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-199894

(43)Date of publication of application : 10.08.1993

---

(51)Int.Cl. C12P 21/08  
C12N 5/18  
// A61K 39/395  
A61K 39/395  
C12N 15/06  
(C12P 21/08  
C12R 1:91 )

---

(21)Application number : 03-196810 (71)Applicant : TAKEDA CHEM IND  
LTD

(22)Date of filing : 06.08.1991 (72)Inventor : IWASA SUSUMU  
HARADA KAORU  
KIYOTA TAKESHI

---

(30)Priority

Priority number 02219629 Priority date 20.08.1990 Priority JP  
: : country :

---

(54) BI-SPECIFIC ANTIBODY AND ANTIBODY-CONTAINING MEDICINE

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain an antifungal agent useful for improving mycosis by reducing the toxicity of a strong-toxic antifungal agent and giving a fungicidal selectivity thereto.

CONSTITUTION: A bi-specific antibody exhibiting specificity to a fungus and to an antifungal agent is prepared and an antifungal immune complex

composed of the antibody immunologically bonded to the antifungal agent is provided. Thereby, the toxicity of a strong-toxic antifungal agent is reduced and the fungicidal selectivity thereof can be improved.

---

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's  
decision of rejection]

[Kind of final disposal of application  
other than the examiner's decision of  
rejection or application converted  
registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of requesting appeal against  
examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

**\* NOTICES \***

JP0 and NCIP1 are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.

3.In the drawings, any words are not translated.

---

**CLAIMS**

---

[Claim(s)]

[Claim 1] The antibody whose one side of duplex singularity it is the hybrid monoclonal antibody which has duplex singularity, and is a thing [ as opposed to / to a fungus / an antifungal in another side ].

[Claim 2] The bispecific antibody according to claim 1 whose antifungal is a polyene system antibiotic.

[Claim 3] The bispecific antibody according to claim 2 whose polyene system antibiotics are amphotericin B. [Claim 4] Antifungal immunity complex which makes an antibody according to claim 1 come to carry out immunity association of the antifungal. [Claim 5] Antifungal immunity complex according to claim 4 whose antifungal is a polyene system antibiotic.

[Claim 6] Antifungal immunity complex according to claim 5 whose polyene system antibiotics are amphotericin B.

[Claim 7] Poly dahoma which produces a hybrid monoclonal antibody according to claim 1.

---

[Translation done.]

**\* NOTICES \***

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

---

**DETAILED DESCRIPTION**

---

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] This invention relates to the hybrid monoclonal antibody which has duplex singularity. One side of duplex singularity is related with the poly dahoma with which another side produces the hybrid monoclonal antibody (it may be hereafter written as Hybrid MoAb) and it to the cell wall glycoprotein or polysaccharide of a fungus, especially a fungus to an antifungal in more detail. This invention makes a fungus combine specifically with the above-mentioned hybrid MoAb the antifungal immunity complex which comes to carry out immunity association of the antifungal again, and relates to the mycosis therapy agent which makes it possible to give a death-dealing operation to a fungus.

[0002]

[Description of the Prior Art] Generally the disease by the fungus is made inveterate and is in the inclination which this mycosis moreover increases by quickly in recent years. For example, many unions of the deep seated mycosis of the terminally ill patient of leukemia or cancer are reported to the transplant patient, the abundant chronic administration patient of an antibiotic or a steroid, the acquired immunodeficiency syndrome patient, and the pan. Ketoconazole and miconazole which are (1) imidazole derivative at these diseases, Full cytosine which is (2) fluoro pyrimidine derivative, And the amphotericin B (it may be hereafter written as APB) which is (3) polyene system antibiotic, trichomycin, nystatin, etc. are used. Although an imidazole derivative, a fluoro pyrimidine derivative, etc. which were mentioned to the above (1) and (2) were comparatively weakened by toxicity, a Tsuguaki change was caused in the cell membrane of a fungus, and APB which sufficient drug effect was not obtained and was mentioned above (3) showed antibacterial [ strong ], but since toxicity was strong, it had the fault of being unable to perform extensive administration or long-term repetitive

administration. On the other hand, the complex of an anticancer antibody and an anticancer agent is produced as a drug which kills a cancer cell alternatively, and clinical application is being carried out as a "missile therapy agent." An anticancer antibody combines with the tumor specific antigen on a cancer cell front face, and these complex says that an anticancer agent subsequently carries out the trauma of the target cancer cell, and brings about mitigation of a dramatic side effect, and enhancement of the anticancer effectiveness by efficient conveyance to the target tumor site of an anticancer agent. production of the complex fixed [ two quality's ] to which the pharmacological activity of one drug falls by the approach of carrying out the chemical bond of the drug to an antibody about production of such anticancer-drug complex is difficult Or the drug which can carry out 3 use is limited. etc. -- there was a fault. Then, the bispecific antibody which has a binding affinity to the both sides of a cancer cell and an anticancer agent was produced, and it became producible [ with high drug effect / the antibody-drug complex which was fixed with the advent of this antibody ].

[0003]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] Since toxicity is very strong, the toxicity of the antifungal which cannot use sufficient effective dose is mitigated, it is attenuated nature and the antifungal which removes [ the dissolution or ] a fungus is offered efficiently.

[0004]

[Means for Solving the Problem] In order that this invention persons might solve many above-mentioned problems in connection with an antifungal, they examined wholeheartedly the antifungal new type using the bispecific antibody which developed remarkably by advance of the latest protein joint technique or cytogamy technique, developed the antifungal-anti-drug bispecific antibody, and produced the high antibody-drug complex of very little drug effect of a side effect using it. That is, this invention is the hybrid MoAb which has duplex singularity, and one side of duplex singularity receives an antifungal, It is related with the poly dahoma with which another side produces the bispecific antibody and it to target fungi (for example, cell wall glycoprotein of *Monilia albicans* (*Candida albicans*:CA) etc.). Moreover, this invention relates to this bispecific antibody at the mycosis therapy agent which comes to carry out immunity association of the antifungal. as the fungus in this invention -- for example, (1) *Coccidioides bacillus* (an example --) *Coccidioides immitis* etc. -- etc. -- *Phycomycetes* -- (2) *Aspergillus* sp. (an example, *Aspergillusterreus*, *Aspergillus Fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, etc.), *Ascomycotina*, such as the *Scopulariopsis bacilli* (an example, *Scopulariopsis blochii*, etc.), (3) *Cryptococcus bacillus* (an example, *Cryptococcus neoformans*, etc.), the *Candida bacilli* (an example, *Candida albicaus*, etc.) and a *Trichosporon bacillus* (an example --) *Trichosporon*



beigelii etc. -- etc. -- the Cryptococcaceae bacillus and Moniliaceae bacillus cutaneum and Trichosporon (an example --) Sporotrichum schenckii, Dematiaceae bacilli, such as Acremonium, potronii and Blastomyces (an example --) dermatitidis and Blastomyces brasiliensis and Histoplasma capsulatum Hormodendrum pedrosoi etc. -- etc. -- fungi imperfecti -- (4) Microsporum (an example, Microsporum audouinii, Microsporum canis, Microsporum gypseum, etc.), Trichophyton (an example --) Trichophyton mentagrophytes, Trichophyton interdigitale, Trichophyton pedis, Trichophyton rubrum, Trichophyton coccineum, Epidermophyton, such as Trichophyton schoenleinii, Trichophyton ferrugineum, and Trichophyton violaceum and Trichophyton (an example --) concentricum Epidermophyton floccosum etc. -- etc., although the fungus which shows virulence to mammals (an example, a mouse, a rat, a cat, a rabbit, a dog, Buta, a horse, a cow, an ape, Homo sapiens, etc.), such as a dermatophyte, is mentioned Even inside Fungi imperfecti are desirable and the Cryptococcaceae bacillus is still more desirable, The Candida bacillus (preferably Candida albicans) is especially used preferably.

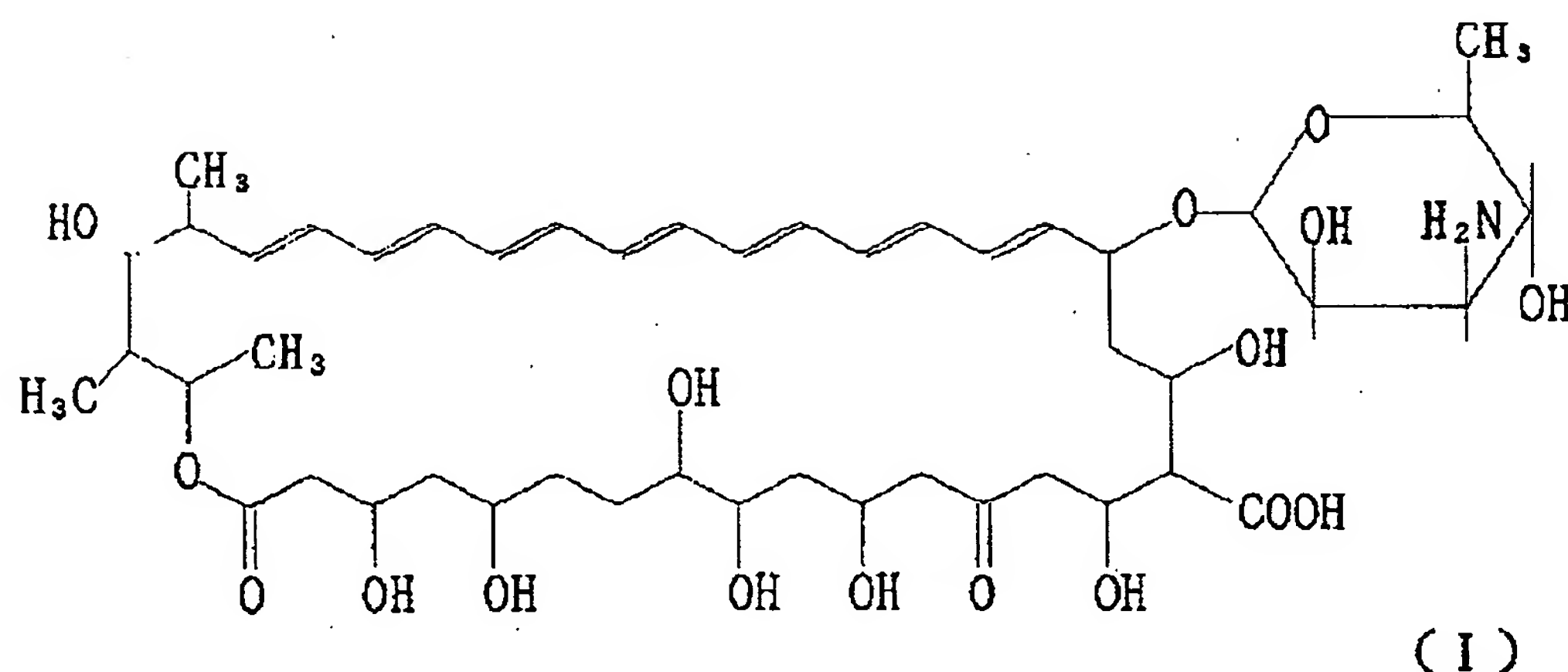
[0005] As an antifungal used by this invention, as a typical thing, for example (1) Griseofulvin, polyene system antibiotic (an example, nystatin, amphotericin B, trichomycin, pimarinic, etc.), variotin, SHIKANIN, pyrrole nit phosphorus, and an EKINO can gin-AKUREASHIN group antibiotic (an example --) EKINO can gin B, AKUREASHINA, etc. and a PAPURA can gin group antibiotic (an example --) antibiotics [, such as AMUBURUCHISHIN, ], such as PAPURA can gin B, and (2) stilbamidine system compound (an example --) stilbamidine isethionate, 2-hydroxystilbamidine isethionate, etc., A JIAMUTAZORU system compound (an example, diamthazole dihydrochloride, etc.), An alkyloxy Benz amide system compound (an example, 2-n-hexyloxy Benz amide, etc.), the Benz imidazole system compounds (an example, KURORU imidazole, etc.) and a thio carbamic acid system compound (an example --) 3-iodine propargyl system compounds (an example --), such as tolnaftate and a TORUSHI crate fluoro pyridine system compounds (an example --), such as Ha ROPUROGIN and MECHIOJIN omega-iodine acetylene nature fatty-acid system compounds (an example --), such as full cytosine an imidazoles system compound (an example --), such as phenyl-11-iodo-10-undecynoate Clotrimazole, MI Kona ZORU, econazole, isoconazole, sulconazole, BUTOKONAZORU, CHI OKONAZORU, bifonazole, cloconazole, oxiconazole, ketoconazole, etc., An N-hydroxy pyridone system compound (an example, cyclo PIROKI SOL amine, etc.), A triazole compound (an example, TAKONAZORU, ICI 153, 066, BIBUNAZORU, fluconazole, itraconazole, etc.), Allylamine system compounds (an example, a NAFUCHI fin, TABINA fin, etc.), Although synthetic compounds, such as triiodo allyl compound system compounds (an example, ME-1207, etc.), etc.

are mentioned, a polyene system antibiotic is \*\* especially. Better  
\*\*\*\*\*.

[0006] Although tetraene antibiotics (an example, amphotericin A, etc.), pen  
TAEN antibiotics (an example, pimaricin, pentamycin, etc.), hexa en  
antibiotics (an example, nystatin, etc.), hepta-en antibiotics (an example,  
amphotericin B, the candicidin, peri mycin, HAAMAISHIN, trichomycin, etc.),  
etc. are raised as a polyene system antibiotic used for this invention It is a  
hepta-en antibiotic preferably, Amphotericin B (preferably amphotericin B) is  
used preferably especially., Amphotericin B contains amphotericin B, its  
derivative, and these salts here. as the derivative of amphotericin B -- for  
example, a (1) N-alkyl derivative (an example --) metaphosin, etaphosin,  
propamphosin, and butamphosin It al(s) and Antibiotiki(s) (Moscow). etc. --  
[Kasumov and Kh.M.et. -- 29 (7), 513(1984)] or N and N, N-trimethyl  
amphotericin B, etc., N-acyl derivatives (an example, N-acetyl amphotericin  
B, etc.) and O-silyl derivative (an example --) 13, 14-Anh Hydronalium  
amphotericin B [the EP public presentation No. 350164 official report] etc.,  
N-friend NOR Sill derivative (an example, N-glycyl amphotericin B, N-lysyl  
amphotericin B, N-D-ORUNI chill amphotericin B, etc.), N-alkyl aminoacyl  
derivative (example, N, and N-dimethyl glycyl amphotericin B etc.), An  
enamine derivative, An amidine derivative etc. Or N-thio propionyl  
amphotericin B, N-full KUTOSHI The (2) above-mentioned derivatives, such  
as the RUAMUHOTE lysine B, N-glucosyl amphotericin B, and 1-(dimethyl  
AMINOPU ROPIRU)-3-ethyl carbodiimide amphotericin B Or the ester  
(amphotericin B methyl ester an example, which alkyl ester, etc.) of  
amphotericin B etc. is raised. Moreover, as these salts, Na salt, a HCl salt,  
N-methyl glucamine salt, etc. are raised.

[0007] If in charge of hybrid MoAb production which has the duplex  
singularity of this invention Although the monoclonal antibody production  
hybridoma to an antifungal is used as one of the raw materials This  
hybridoma, For example, an anti-APB monoclonal antibody production  
hybridoma is produced by the following approach., APB (refer to the following  
type (I)) or its derivative is first inoculated into an animal, and production of  
an anti-APB antibody is urged. in this case, having usually used APB or its  
derivative as immunogen as it was -- if -- since the antibody production of a  
high potency cannot be caused, it combines with the cow serum albumin (it  
may be hereafter written as BSA) which is cariea protein, keyhole limpet  
hemocyanin (it may be hereafter written as KLH), or thyroglobulin through  
the carboxyl group or amino group which APB has -- making -- immunogen  
\*\*\*\*\* -- it uses.

[Formula 1]



Amphotericin B (m.w. 924)

As an immune animal, although the mammals, for example, a rabbit, a rat, a mouse, a guinea pig, etc. are generally used, it is MoAb. In manufacture, a mouse is used especially preferably. That what is necessary is just to follow the approach usually enforced as the inoculation approach, 10–25microg is preferably emulsified by the physiological saline and Freund's complete adjuvant of the amount (0.1ml) of isochore, and 1 time 1–100microg and the approach of inoculating into intraperitoneal [ of regions of back and an abdomen / hypodermically or intraperitoneal ] 3 to 6 times every 2–3 weeks are taken by the mouse.

[0008] An individual with high antibody titer is chosen from these immune animals, for example, a mouse, a spleen and/, or lymph gland is extracted three – five days after the last immunity, and the antibody forming cell contained in them is united with a myeloma cell. Although fusion actuation can be carried out according to a known approach and a polyethylene glycol (it may be hereafter written as PEG), Sendai Virus, etc. are mentioned as a fusion accelerator, PEG is used preferably. Especially as a myeloma cell, P3U1 is preferably used for NS-1, P3U1, SP2/0, etc. For example, the desirable ratios of a spleen cell and a myeloma cell are 1:1–10:1, and are good for PEG of molecular weight 1,000–9,000 to be added by this by 10 – 80% of concentration, and for 20–37 degrees C to incubate at 30–37 degrees C preferably for 3 to 10 minutes. Various approaches can be used for screening of an anti-APB mouse monoclonal antibody production hybridoma. For example, APB which combined the human serum albumin (it may be hereafter written as HSA) is made to stick to a microplate, and a solid phase-ized antigen is produced. Subsequently, a hybridoma culture supernatant is added to these antigen sensitization microplates, and the antibody titer in a culture supernatant is measured with the enzyme immunoassay (it may be hereafter written as EIA) detected by the anti-mouse immunoglobulin antibody which carried out the horseradish peroxidase (it may be hereafter written as HRP) indicator of the anti-APB



specific antibody combined with the plate. Although cloning is immediately presented with the hybridoma of the sorting and the antibody activity positivity by which the breeding was carried out in a HAT (hypoxanthine aminopterin thymidine) addition culture medium, this is usually easily carried out by limiting dilution etc. The antibody titer of the cloned hybridoma culture supernatant can be measured by the above-mentioned approach, the hybridoma which produces an antibody with a stably high potency can be chosen, and the monoclonal anti-APB specific antibody production hybridoma made into the purpose can be acquired. The mouse hybridoma ATB 1-114 shown in the below-mentioned example 1 as an example of the anti-APB mouse monoclonal antibody (IgG1, kappa chain) production hybridoma produced according to the above manufacturing methods is mentioned. On the other hand, the antifungal monoclonal antibody production hybridoma which is one of the raw materials is produced by the following approach.

[0009] As an antigen of the fungus made into a target, it is the cause-of-a-disease bacillus of candidiasis, for example. The cell wall glycoprotein or polysaccharide (mannan) of the heating killed bacteria of *Candida albicans* (it may be hereafter written as CA), or formalin processing killed bacteria itself or these killed bacteria is used. The latter mannan antigen is refined according to a well-known approach, and is usually prepared by [A.Cassone:journal OBU medical treatment microbiology (J.Med.Microbiol.) and 27,233 (1988)] and the following approach. 1) Carry out autoclave processing of the fungus body (CA) (120 degrees C, 90 minutes), and it is the centrifugal separation back, The Fehling's solution is added to digestive liquor. 2) It is the extraction back by centrifugal separation actuation about the obtained precipitate, A hydrochloric acid is added, and it dissolves and adds to methanol acetic-acid mixture. 3) Add and wash a methanol to dregs after centrifugal separation. Furthermore centrifugal separation is carried out, the little ether is added to dregs, and it is air-dry at a room temperature. It sets to the immunity actuation to a mouse, and, in the case of heating killed bacteria or formalin processing killed bacteria, they are 10<sup>6</sup>-10<sup>8</sup> pieces/animal at once, for example, Preferably, 0.5 to 2x10<sup>7</sup> pieces are suspended in the phosphoric-acid salt buffer solution (it may be written as the following and PBS), and the approach of inoculating 3 to 8 times every 2-3 weeks is taken. Immunity of a mannan antigen is carried out like the case of the APB-carriera protein complex mentioned above. Hereafter, fusion actuation with the antibody forming cell and myeloma cell which were extracted from these immune animals can be carried out like the approach which described APB.

[0010] Various approaches can be used for screening of an antifungal monoclonal antibody production hybridoma. For example, what scattered

heating killed bacteria or formalin processing killed bacteria to the microplate, and was fixed with formalin after desiccation by 45 degrees C is used as a solid phase antigen. Or the method of carrying out sensitization of the mannan antigen obtained by the above-mentioned approach to a microplate by 10-100microg [/ml ] concentration, and acquiring antigen solid phase is also used. A hybridoma culture supernatant is added to the antigen sensitization microplate produced as mentioned above, and the antibody titer in a culture supernatant is measured by EIA which detects the antifungal antibody combined with the plate by the 2nd antibody of a HRP indicator. Cloning is immediately presented with the hybridoma of an antibody activity positivity by the above-mentioned approach, and it can acquire the monoclonal antibody production hybridoma which has a binding affinity in a fungus. The mouse hybridoma CA 3-2-12 shown in the below-mentioned example 2 as an example of the antifungal mouse monoclonal antibody (IgG1, kappa chain) production hybridoma produced according to the above manufacturing methods is mentioned.

[0011] There are some approaches in producing the hybrid MoAb which has the duplex singularity of this invention. One is a chemical approach and it carries out covalent bond of antifungal unique MoAb and the MoAb to an antifungal in this case. Moreover, the cell fusion of two sorts of hybridomas which produce antifungal unique MoAb and MoAb to an antifungal as an exception method, respectively is carried out, and there is the approach of producing hybrid hybridomas (an example, tetra-OMA, etc.) and producing the target bispecific antibody. As a means to obtain the antibody of the high fixed quality with sufficient yield in large quantities, the latter hybrid hybridoma method is used preferably. In order to combine two sorts of MoAb(s) chemically, the substituent which exists in an antibody molecule, for example, the amino group, a carboxyl group, hydroxyl, or a sulfhydryl group can be used. The reactant amino group of (1) one antibody, and the reactant carboxyl group of another side For example, the example of water-soluble carbodiimide reagent [ 1-ethyl -3 -(3-dimethylaminopropyl)- A carbodiimide, 1-cyclohexyl -3 -(2- morpholino ethyl)- Carry out dehydration condensation in an aqueous solvent using], such as carbodiimide-p-toluene sulfonate. (2) -- on the other hand, the reactant amino group of an antibody -- N-HIDOROKI the example of activity ester [of CISC SHIMIDO -- p-maleimide methylcyclohexane -1 - After making it react with], such as carboxyl-N-hydroxy SUKUSHIMIDO ester and N-(epsilon-maleimide KAPURO yloxy) SUKUSHIMIDO ester, and maleimide-izing, i) The antibody which returned the antibody of another side by dithiothreitol (it may be hereafter written as DTT), Or it is N-SUKUSHIMIJIIRU-3-(2-pyridyl dithio) PU to the antibody of ii another side. ROPIONETO The antibody which introduced the sulfhydryl group with (it may be hereafter written as SPDP),

Or carry out thioether association of the antibody of iii another side with the sulfhydryl group of the Fab' fraction obtained by carrying out pepsin digestion post reduction. (3) Two sorts of reactivity of both antibody Combine the amino group using dialdehyde reagents, such as succindialdehyde and glutaraldehyde. (4) It is SURUFU at reduction or SPDP in DTT about two sorts of antibodies. A HIDORIRU radical is introduced. (5) 2 sort antibody which produces a heterodimer by reoxidation It reoxidates, after carrying out pepsin digestion post reduction for each and considering as Fab', and it is a Fab' hetero die. There is the approach of producing MA. MUNOROJI (J.Immunol.) moreover, various these approaches are combined -- the \*\* which does not spoil two sorts of antibody activity as much as possible -- efficient -- target hetero DAIME -- the report which produces a rucksack bispecific antibody -- it is -- [ -- M.J.Glennie:journal OBU I [ ] -- 139, 2367(1987); Kitagawa Tsunehiro: Organic synthesis Chemistry and 42,283(1984)], It can use for production of the duplex singularity hybrid MoAb of this invention. After the above ligation reaction termination and a bispecific antibody connective are sephadex G100 or G200, sepharose 6B or 4B, and URUTOROGERU. It can refine or isolate preparatively with gel filtration chromatography, such as AcA44 or 34, and sephacryl S200. Or an alternative aliquot is also possible by combining the affinity chromatography using an antigen joint column.

[0012] There is some technique in production of the hybrid hybridoma which produces the hybrid monoclonal antibody which has the duplex singularity of this invention. The example of [, Yoji Niimoto et al.:], such as protein, a nucleic acid and an enzyme, and 33,217 (1988), although which approach may be used, for example The culture medium of 5-bromodeoxyuridine (it may be hereafter written as BrdU) addition is made to acclimate gradually the hybridoma which produces MoAb to the antifungal of the HAT resistance of which \*\* above was done, a thymidine kinase deficit stock is cloned, and it considers as HAT susceptibility. Let the antifungal unique MoAb production hybridoma of HAT resistance similarly be 8-azaguanine (for it to be hereafter written as AZG) resistance, A

hypoxanthine-guanine-phosphoribosyl-transferase deficit stock is cloned, and it considers as HAT susceptibility. Tetra-OMA obtained by uniting both according to a conventional method by the HAT addition culture medium Subsequently, after sorting, Clone tetra-OMA which secretes the hybrid MoAb which has a binding affinity in both fungus and antifungal. An antifungal unique MoAb production hybridoma \*\* A fluorescein isothiocyanate An indicator is carried out with (it may be hereafter written as FITC), and both are united for the hybridoma which produces MoAb to another antifungal after an indicator according to a conventional method by tetramethyl RODAMIN isothiocyanate (it may be hereafter written as TRITC). A



fluorescein bitter taste tee bay TIDDO cell sorter (it may be hereafter written as FACS) is presented with the obtained cell suspension, and the approach of sorting out and cloning tetra-OMA which has the fluorescence of the green of FITC and the red of TRITC in coincidence is mentioned. Moreover, it is also possible to completely use the marker of a parents stock, making it reverse, and to sort out and clone tetra-OMA. if in charge of the cell fusion in these actuation -- fusion accelerators, such as Sendai Virus and PEG, -- or approaches, such as electrical stimulation, are used. Although PEG is used preferably and that example is given to below, of course, it is not limited to this approach. That is, PEG(s), such as about 10 - 80% of molecular weight about 1,000 to 9,000 concentration etc., are used, and although the processing times are about 0.5 - 30 minutes, as an example of desirable conditions, for about 4 - 10 minutes, about 35 - 55% of PEG6,000 can be contacted into a cell, and can be efficiently united at 37 degrees C. [0013] Although selection of poly dahoma (an example, tetra-OMA, etc.) can be carried out by the above-mentioned HAT addition culture medium etc., for this reason, each drug tolerance stock is acquired by the drugs acclimating methods, such as 8-AZG, 6-thioguanine (6-TG), or 5-BrdU. Moreover, various selective media are used by installation to the new syncytium of a marker. As such an example, a neomycin, a hygromycin B addition culture medium, etc. are mentioned [B.Sugden:molecular - and - cellular biology (Mol.Cell.Biol.) and 5,410 (1985)]. [L.Karawajew et al. whom the approach of carrying out sorting of the hybrid hybridoma by which united the hybridoma which carried out the indicator by different fluorochrome as furthermore described above, and the double labelling was carried out by FACS also has: Journal OBU immuno logical MESOZZU (J. Immunol. Methods), 96,265(1987)]. Various approaches can be used for screening of hybrid MoAb production poly dahoma. For example, concomitant use of EIA for screening of the antifungal unique monoclonal antibody production hybridoma which carried out 1 above-mentioned, and the hybridoma which produces the monoclonal antibody to an antifungal, 2) \*\*\*\*\*-ed is added to the microplate which combined the glycoprotein or polysaccharide of a fungus or the fungus origin. Next, EIA for the hybrid monoclonal antibody detection which adds the antifungal-HSA complex which carried out the HRP indicator, and has duplex singularity, Or when using the mouse monoclonal antibody to the antifungal belonging to a different subclass from an antifungal unique mouse monoclonal antibody 3) \*\*\*\*\*-ed is added to the glycoprotein or the polysaccharide joint microplate of a fungus or the fungus origin. Next, it can use, combining suitably EIA which adds this anti-mouse IgG subclass specific antibody that carried out the HRP indicator, and detects a duplex singularity monoclonal antibody, the strange method of these, etc.

[0014] Although cloning is immediately presented with the poly dahoma of a

hybrid MoAb activity positivity, this is usually easily carried out by limiting dilution etc. About the culture supernatant of the cloned poly dahoma, the monoclonal hybrid MoAb production poly dahoma made into the purpose is acquirable by measuring the antibody titer by the above-mentioned approach, and choosing the poly dahoma which produces an antibody with a stably high potency. Culture of the poly dahoma of above-mentioned this invention can usually be carried out by the well-known approach by intraperitoneal [ of an animal ] (for example, intraperitoneal [ of mammals, such as a mouse, ]) among a liquid medium. It can do by using combining a well-known biochemical model about purification of culture medium and an antinode underwater antibody. For example, centrifugal separation of cell culture liquid or the ascites is carried out, supernatant liquid is taken out, and a salting-out (an ammonium sulfate or a sodium sulfate is usually used) is carried out. The obtained protein precipitate can be dissolved in a suitable solution, the column chromatographies after dialysis (an ion exchange column, a gel-filtration column, a protein A column, hydroxyapatite column, etc.) can be given, and separation purification of the target antibody can be carried out. By the above separation purification actuation, about 1-5mg of hybrids MoAb of 80% or more of purity can be obtained from a 1l. culture supernatant by the protein weight ratio. Moreover, 3-10mg of same antibodies is obtained from antinode water of 20 ml. The hybrid MoAb which has the duplex singularity acquired as mentioned above is uniform as protein, and mammalian can be medicated with it like a well-known immunoglobulin manufacture at insurance. Moreover, by proteolytic enzyme processings (pepsin etc.) etc., F(ab')<sub>2</sub> fragment holding the binding affinity to a fungus and an antifungal etc. can be obtained, and these can be used for the same purpose as the hybrid MoAb of this invention. Tetra-OMA ACT 1-1.18 shown in the below-mentioned example 3 as an example of the hybrid antibody production poly dahoma produced according to the above manufacturing methods is mentioned. In addition, although the example of tetra-OMA of an antifungal unique MoAb production hybridoma and the hybridoma which produces MoAb to an antifungal was given as poly dahoma which produces the hybrid MoAb of this invention The cell which produces TORIOMA or each MoAb of the hybridoma which produces one MoAb, and the cell which produces MoAb of another side by an Epstein-Barr virus etc. After immortality-izing, If the hybrid MoAb of this invention is produced even if it is the hybridoma obtained by carrying out cell fusion, it can use for the same purpose as above-mentioned tetra-OMA. Moreover, these poly dahoma is Mouse IgG. In producing MoAb DNA which carries out the code of the variable region or hypervariable region containing the antigen recognition site of this duplex singularity hybrid MoAb is acquired. this -- genetic manipulation technical [Z.Steplewski et al. -- :proceedings OBU National



academy Science U.S.A. (Proc.Natl.Acad.Sci.USA) -- Homo sapiens's IgG constant region and the gene which carries out the code of the framework region further can be combined using 85 and 4852(1988)], and a mouse-Homo sapiens chimeric antibody or a Homo sapiens mold-ized antibody can also be produced. On the occasion of administration to Homo sapiens, since antigenic is small, this chimeric antibody is used advantageously.

[0015] Some approaches are used in the mycosis cure using the alternative antifungal immunity complex produced from the duplex singularity hybrid MoAb of this invention, or an antifungal and this duplex singularity hybrid MoAb. for example, a mycosis patient is beforehand medicated with the hybrid MoAb of 1 this invention an antifungal (for example, APB) is prescribed for the patient after sufficient time amount progress in order to make it combine with the fungus increased in a patient body -- a mycosis patient is medicated with the 2 this hybrid MoAb and an antifungal at coincidence. 3 [ or ] -- beforehand -- this hybrid A mycosis patient is medicated with the alternative antifungal immunity complex which MoAb and an antifungal were made to react and was obtained after separating an unreacted antifungal. etc. -- an approach is mentioned. Furthermore, the antifungal immunity complex of this invention may be used combining two or more (for example, an antifungal anti-APB hybrid MoAb-APB immune complex and an antifungal anti-full cytosine hybrid MoAb-full cytosine immune complex) sorts, and may use together one sort or two sorts or more of toxic low antifungals, and the antifungal immunity complex of this inventions (an example, full cytosine, etc.). The antifungal immunity complex containing the hybrid MoAb of this invention After the filtration disinfection actuation by well-known approach, for example, membrane filter etc., etc., mix with itself or the proper support which may be permitted in pharmacology, an excipient, a diluent, etc. as occasion demands, and it pharmaceutical-preparation-izes as injections etc. Mammalians (an example, a mouse, a rat, a cat, a rabbit, a dog, Buta, a horse, a cow, an ape, Homo sapiens, etc.) can be medicated, for example, it can use for the therapy of candidiasis, cryptococcosis, aspergillosis, or MUKORU \*\* (preferably candidiasis).

[0016] When carrying out vein administration, it is preferably good [ the dose of the antifungal immunity complex of this invention / about one to 100 mg/kg / asmg / about 2-30 / / kg, and an antifungal ] for the adult patient of candidiasis per day, although it changes with the target disease, a symptom, or administration roots as a hybrid MoAb to prescribe a medicine for the patient so that it may become about 0.04 to 0.5 mg/kg preferably about 0.02 to 1.5 mg/kg per [ APB ] day, for example. By using as mentioned above, the antifungal immunity complex of this invention neutralizes the side

effect of a compound that it has an antifungal, especially strong toxicity like APB combinable specifically to a target fungus, by immunity association with it and the hybrid antibody which reacts, and offers the fungus remedy with the extremely excellent fungus singularity from which a fungus can be dissolved or removed efficiently. Thus, that the powerful antifungal activity which APB has is demonstrated specifically in a target site, and the toxicity is moreover completely neutralized before target site attainment is the property which it was at the time compared with the conventional chemotherapeutic drug. Conventionally, since a bigger curative effect can be mentioned with a smaller dose, since toxicity is very strong, by using together with the hybrid MoAb of this invention the antifungal which could not use sufficient effective dose, the toxicity is mitigated sharply and the alternative fungus trauma by this antifungal becomes possible.

[0017]

[Example] Although the example of reference and an example explain this invention concretely below, it cannot be overemphasized that it is not that to which these restrict the range of this invention. In addition, deposition is performed as the animal cell used in the example of reference and the example is shown in the following [table 1].

[Table 1]

----- \*\* Object \*\* \*\* (IFO) (FRI) IFO No. FERM  
No. ----- mouse hybridoma ATB 1-114 50253  
3069 Mouse hybridoma CA 3-2-12 50252 3070 Mouse hybridoma ACT  
1-1.18 50343 12365 ----- IFO: Institute for  
Fermentation, Osaka FRI (Osaka): Ministry of International Trade and  
Industry Agency of Industrial Science and Technology Fermentation  
Research Institute [0018] Example 1 of reference APB maleimide-ized by  
preparation N- (gamma-maleimidebutyloxy SAKUSHINIMIDO) (it may be  
hereafter written as GMBS) of the EIA(1) solid-phase antigen for  
anti-amphotericin B antibody measurement was added to HSA which carried  
out qualification reduction by SPDP and DTT beforehand, and APB-HSA  
complex was produced. 7.6 APB molecules per one mol of HSA were  
introduced. G-sephadex 25 column removed unreacted APB and an  
unreacted reaction reagent, subsequently to 96 hole microplate, this  
50microg [ / ml ] protein complex was added at a rate of 100microl / well, and  
the solid phase antigen was prepared.

(2) 100micro of assay \*\*\*\*\* mouse hybridoma culture supernatants I was  
added on the above-mentioned antigen sensitization plate, and it was made  
to react at a room temperature for 2 hours. The HRP indicator rabbit  
anti-mouse IgG antibody was fully added for the plate after washing 0.05%  
with the Tween 20 content 20mM phosphoric-acid salt buffer solution (an  
abridged notation is carried out to PBS-Tw below pH7.3;), and it was made

to react at a room temperature further for 2 hours. the 0.1M citrate buffer solution which contains an ORUSO phenylenediamine and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as an enzyme substrate after washing -- each -- in addition to the well, the enzyme reaction was carried out at the room temperature. The amount of coloring coloring matter was measured on the wavelength of 492nm after the reaction halt using the multi-scan (flow company make) with 1-N sulfuric acid.

[0019] Example 2 of reference The fungus body of the preparation CA of the EIA(1) solid-phase antigen for antifungal antibody measurement was added after autoclave processing (120 degrees C, 90 minutes), stirring the Fehling's solution to digestive liquor. 3N-hydrochloric acid was added to the obtained dregs, and it was dropped at methanol-acetic-acid (8:1) mixture after the dissolution. CA cell wall origin mannan antigen was acquired by a methanol's washing dregs several times after centrifugal separation, and removing small quantity, in addition a methanol and carrying out sensitization of the ether at a room temperature further. This 100microg [ /ml ] mannan antigen liquid was added at a rate of 100microl / well to 96 hole microplate, and the solid phase antigen was prepared.

(2) example of the assay method reference 1- according to the approach of a publication, it carried out to (2).

[0020] Example 3 of reference Preparation of the EIA(1) labelled antigen for anti-APB-antifungal bispecific antibody measurement The APB-HSA complex produced by example of reference 1-(1) was biotin-ized using biotin activation ester (vector company make), and EIA was presented.

(2) example of the assay method reference 2- mannan antigen sensitization Ma who produced by (1) 100micro of bispecific antibody content test liquids I was added on the IKURO plate, and it was made to react to it at a room temperature for 2 hours. The biotin-ized APB-HSA complex produced after washing a plate (1) was added by PBS-Tw, and it was made to react at a room temperature for 1 hour. Furthermore, the after [ washing ] and avidin indicator HRP was fully added by PBS-Tw, and the plate was made to react at a room temperature for 1 hour. The enzyme activity combined with solid phase was measured by the approach of a publication to example of reference 1-(2).

[0021] Example 4 of reference The mannan antigen prepared by example of production reference 2-(1) of a mannan column was oxidized and cleft by sodium periodate, and the produced aldehyde group was reacted and combined with the amino group of EAH-sepharose 4B (Pharmacia manufacture). Subsequently, it returned with cyano \*\* boron sodium, and mannan joint sepharose was produced.

[0022] example 1 APB 1.8mg maleimide-ized by the preparation GMBS of the production (1) immunogen of a mouse anti-APB antibody production



hybridoma is added to BSA 10mg beforehand sulfhydryl-ized by SPDP and DTT -- the overnight reaction was carried out at 5 degree C. When the amount of APB association was measured by ultraviolet absorption spectrometry after purification in G-sephadex 25 column, 6.8 APB molecules per one mol of BSAs were introduced.

(2) \*\* The equivalent Freund's complete adjuvant was added to the \*\* APB-BSA 1mg [/ml ] complex physiological saline solution, and the regions of back of a mouse (0.1mg / 0.2ml / mouse) and the immunity of an abdomen hypodermically were started. the Freund's incomplete adjuvant of equivalence [ booster / immunogen ] -- in addition, it inoculated 4 times and carried out every two to three weeks. Ten days after [ 4 times of ] the booster, the same APB-BSA complex (200micro g/0.1ml physiological saline / mouse) was administered intravenously about the individual which showed the greatest blood serum antibody titer in EIA of a publication to the example 1 of reference.

(3) The spleen was extracted in three days after the cell fusion last immunity, and spleen cell suspension was prepared with the conventional method (about 10<sup>8</sup> pieces). Subsequently, 2x10<sup>7</sup> mouse myeloma cells (P3U1) were added, and cell fusion was presented according to the approach [Nature (Nature) and 256,495 (1975)] of Kohler and Milstein using PEG6000. After fusion termination, cell mixture was suspended in the so-called HAT medium containing hypoxanthine aminopterin and thymidine, and was cultivated for ten days. Henceforth, as soon as selection of a parent cell was completed, henceforth it replaced with HT culture medium excluding aminopterin from the HAT medium, and culture was continued.

(4) The hybridoma culture supernatant was extracted about the well as which selection of a hybridoma and cloning cell proliferation were regarded, and antibody titer was measured for the example 1 of reference in EIA of a publication. Cloning by limiting dilution was carried out about the hybridoma which produces the strong antibody of especially a binding affinity, and the anti-APB monoclonal antibody production mouse hybridoma ATB 1-114 was obtained. The subclass of the antibody which this hybridoma produces was IgG1 (kappa chain).

(5) The 10<sup>7</sup> mice [/animal ] hybridoma ATB 1-114 was injected intraperitoneally to the hybrid nude mouse (Jcl:AF-nu) which injected the \*\*\*\*\* 0.5ml mineral oil of an antibody intraperitoneally. Since storage of ascites was seen ten to 20 days after abbreviation, it was extracted, and it salted out with the saturation ammonium sulfate 45%, and the IgG fraction was obtained. The protein A column was presented after dialysis by PBS (pH7.5), it was eluted with the glycine and the hydrochloric-acid buffer solution of pH2.9, and the purification antibody was obtained. About 34mg anti-APB unique mouse MoAb ATB 1-114 was acquired from 10ml of

ascites. (6) EIA given [ the culture supernatant of the mouse hybridoma ATB 1-114 acquired by the description (1) above (4) of an antibody ] in the example 1 of reference was presented, and the antibody dilution curve was produced. The obtained result was as having been shown in drawing 1 .

Consequently, the antibody ATB 1-114 showed the strong binding affinity to APB also in the resistor concentration diluted to 3,000 or more times.

(7) At APB (25microg/(ml)) and the room temperature of isolation, the culture supernatant of the mouse hybridoma ATB 1-114 acquired by the description (2) above (4) of an antibody was made to react for 1 hour, and, subsequently to EIA given [ the mixture ] in the example 1 of reference, was offered. The obtained result was as having been shown in drawing 1 .

Consequently, the competitive coupling inhibition by APB of isolation was seen, and it was shown that the above-mentioned antibody ATB 1-114 is specific to APB.

[0023] Example 2 Two sorts of antigens, heating killed bacteria and a mannan antigen, were used as preparation immunogen of the production (1) immunogen of an antifungal antibody production hybridoma. Heating killed bacteria was produced by washing the fungus body of CA with a physiological saline after 2-hour processing at 100 degrees C. The mannan antigen was produced by the approach shown in example of reference 2-(1).

(2) \*\* The equivalent Freund's complete adjuvant was added to 108 \*\*\*\*\* killed bacteria / mIPBS suspension, and immunity was carried out to hypodermically [ of a mouse (107 piece / 0.2ml / mouse) / the regions of back and hypodermically / abdomen ]. Immunity of the heating killed bacteria of tales doses was carried out with the Freund's incomplete adjuvant after three weeks. Subsequently, it is two-week spacing and immunity of the mannan antigen (100micro g/0.2ml / mouse) suspended in the equivalent Freund's incomplete adjuvant was carried out 2 to 3 times. Ten days after, it is shown in the example 2 of reference. About the individual which showed the blood serum antibody titer greatest by \*\* EIA, the same mannan antigen liquid (g/0.1ml of 10 0 micro, mouse) was administered intravenously.

(3) According to the approach of a publication, it carried out to cell fusion example 1-(3).

(4) EIA selection of a hybridoma, and given in the example 2 of cloning reference -- the antibody titer of a hybridoma culture supernatant -- measuring -- antibody-positive -- a well -- example 1- (4) was presented at cloning according to the approach of a publication. The result, The antifungal antibody production mouse hybridoma CA 3-2-12 which shows a binding affinity strong against a mannan antigen and CA fungus body was obtained. The subclass of the antibody produced by this hybridoma was IgG1 (kappa chain).

(5) According to the approach given in purification example 1-(5) of an



antibody, antinode hydration was carried out using the hybrid nude mouse. Furthermore, the antibody IgG fraction was obtained with the protein A column. About 29mg antifungal unique MoAb CA 3-2-12 was acquired from 10ml of ascites.

(6) EIA given in the example 2 of reference was presented with the culture supernatant of the mouse hybridoma CA 3-2-12 acquired by the description (1) above (4) of an antibody, and the antibody dilution curve was produced. The obtained result was as having been shown in drawing 2. Consequently, having a strong binding affinity to a mannan antigen was shown.

(7)  $3 \times 10^6$ – $5 \times 10^7$  heating [ /ml ] killed bacteria was added to the hybridoma culture supernatant given in the description (2) above (6) of an antibody, and it was made to react to it at a room temperature for 1 hour. EIA given in the example 2 of reference was presented with the supernatant liquid after centrifugal separation. The obtained result was as having been shown in drawing 3. Consequently, absorption of the antibody by the fungus body was seen and it was shown that the above-mentioned antifungal antibody is a thing to the cell wall mannan antigen on the front face of a fungus body.

(8)  $10^7$  CAs [ /ml ] fungus body suspension was added to the hybridoma culture supernatant given in the description (3) above (6) of an antibody, and it was made to react for 90 minutes at 37 degrees C. The FITC indicator rabbit anti-mouse IgG antibody after washing a fungus body was added by centrifugal separation actuation, and it was made to react for 60 minutes at 4 degrees C. Again, after washing a fungus body, it suspended in PBS and analyzed by FACS. The obtained result was as having been shown in drawing 4. Consequently, although fluorescent staining of the CA fungus body was not carried out at all in a fresh culture medium and one to anti-APB antibody production mouse hybridoma ATB114 culture supernatant, it was shown by antifungal antibody production mouse hybridoma CA3-2 -12 culture supernatant that the antibody which fluorescent staining of the fungus body front face was strongly carried out, and it has combined to a fungus body surface cell wall strongly exists.

[0024] Example 3 By the 0.5microg/mlFITC and 1.5microg/mlTRITC content ISUKOFU-hum F12 mixing culture medium, it incubates for 30 minutes and fluorescent staining of the 37 degrees C of the anti-APB antibody production mouse hybridomas ATB 1-114 acquired in the antifungal antibody production mouse hybridoma CA 3-2-12 acquired in the manufacture (1) (1) cell-fusion example 2 of the hybrid monoclonal antibody which has anti-APB-antifungal duplex singularity, and the example 1 is carried out, respectively. Subsequently, after adding an LSM solution (Wako Pure Chem industrial KK. sale) and removing a dead cell, both hybridomas are mixed at a rate of 1:1 and cell fusion is carried out using PEG6000. 25,000 cells by which the double stain was carried out by the fluorescein and the rhodamine

by presenting FACS after 2-hour incubation at 37 degrees C -- isolating preparatively -- a degree -- as a feeder -- mouse thymocyte --  $5 \times 10^5$  pieces / well -- to 96 hole microplate which carried out seeding, ten pieces / well comes out comparatively, and seeding of the above-mentioned double-stain cell is carried out, and it is cultivated to it.

(2) Present the example 3 of reference further in EIA given [ the culture supernatant of the well as which cell proliferation was regarded in one to two weeks after selection of a hybrid hybridoma, and cloning fusion ] in the examples 1 and 2 of reference, and EIA for bispecific antibody measurement which is a publication, and measure antibody activity. Cloning by limiting dilution is carried out about the well which showed high hybrid antibody activity, and target bispecific antibody production tetra-OMA is acquired. Thus, the subclass of the bispecific antibody produced by the obtained bispecific antibody production mouse hybrid hybridoma ACT 1-1.18 was IgG1 (kappa chain).

(3) Purification (1) which is a hybrid antibody Intraperitoneal inoculation of tetra-OMA of 107 piece / mouse is carried out at the hybrid nude mouse which injected 0.5ml mineral oil intraperitoneally beforehand. Since storage of ascites is seen 17 to 23 days after abbreviation, it is extracted, and it salts out with a 45-50% saturation ammonium sulfate, and an IgG fraction is obtained. A SPB-HSA joint SERURO fine column is presented after dialysis by PBS (pH7.5), and it is eluted with the 0.2M glycine and the hydrochloric-acid buffer solution of pH2.9. The hybrid antibody which has the anti-APB-antifungal duplex singularity of this invention further with the high speed liquid chromatography [ fraction / acid elution ] using a hydroxy apatite column is acquired after dialysis by PBS.

(4) The mannan joint sepharose column produced in the example 4 of reference after dialysis was presented with the IgG fraction obtained by the same approach as purification (2) of a hybrid antibody, and (3) by PBS (pH7.5), and it was fully eluted with the MAPS-II elution buffer solution (Bio-Rad make) after washing in PBS. The anti-APB-antifungal bispecific antibody ACT 1-1.18 of this invention was further acquired after dialysis by PBS with the high performance chromatography [ fraction / elution ] using DEAE-5PW column [7.5x75mm; Toso]. The obtained result was as having been shown in [ drawing 6 ]. The single peak which shows bispecific antibody activity by the approach shown in the example 3 of reference was acquired (refer to drawing 6 -(C)). About 12mg hybrid antibody was acquired from 20ml of ascites.

(5) 107 formalin [/ml ] processing virulence yeast-fungus object suspension was added to the purification hybrid antibody ACT 1-1.18 given in the description (1) above (4) of a hybrid antibody, and it was made to react to it at 37 degrees C for 1 hour. The reactivity of a hybrid antibody was analyzed

after washing a fungus body using FACS in the way of example 2-(8) by centrifugal separation actuation. The obtained result was as having been shown in drawing 7 -14. Consequently, a hybrid antibody ACT 1-1.18 is two sorts. *Candida albicans* They are others although each reacts to TA and CaN strongly. It did not react to five sorts of *Candida*(s). Moreover, *Cryptococcus neoformans* It received and reactivity was shown slightly.

(6) APB hemolysis was used in order to measure the toxic neutralization ability to APB of the description (2) hybrid antibody ACT 1-1.18 of a hybrid antibody [a Shiro Yoshioka: fungus magazine and 29,127 (1988)]. That is,  $3 \times 10^6$  washing human erythrocytes were added to APB of various concentration, and it incubated for 10 minutes at 37 degrees C. The hemoglobin concentration of digestive liquor was measured by 540nm after centrifugal separation. The obtained result was as having been shown in drawing 15. APB showed strong hemolysis activity by 20 ug(s)/ml [ more than ] concentration. Next, the purification hybrid antibody ACT 1-1.18 of various concentration was added to APB 60ug/ml, and it incubated for 30 minutes at 37 degrees C. Subsequently,  $3 \times 10^6$  washing human erythrocytes were added, hemolysis was carried out in the same way as the above, and the hemoglobin concentration which separated to supernatant liquid was measured. The result was as having been shown in drawing 16. 60 ug(s)/ml APB was completely neutralized by the one to 2 mg/ml antibody. This result showed that the hybrid antibody of this invention had strong toxic neutralization ability.

(7) the description of a hybrid antibody — (3) CDF1 mouse (\*\*:18-22g) *Candida* The intravenous injection of the 0.2ml physiological saline suspension of an *albicans* TA 8xfifty percent lethal dose unit (fifty percent lethal dose: 50% lethal dose) was given. Two days after infection, 0.5ml of physiological saline solutions of APB (40 ug/ml) or APB / bispecific antibody immune complex (a mole ratio 1:1, 40 ug(s)/ml as APB) was injected intraperitoneally, and followup of the survival rate was carried out till the 30th. The result obtained using the mouse of one groups [ five ] was as having been shown in drawing 17. Although extension of survival time was seen also in the APB monopharmacy group rather than the drugs group non-prescribing a medicine for the patient, by the immune complex administration group, the improvement was observed further.

[0025] Example 4 Anti-APB antibody ATB 1-114 acquired in the maleimide-ized example 1 of the manufacture (2) (1) anti-APB antibody of the hybrid monoclonal antibody which has anti-APB-antifungal duplex singularity 50micro of dimethylformamide solutions I of N-(epsilon-maleimide KAPURO yloxy) SUKUSHIMIDO ester of 2 double mol was added, and it was made to react for 20 minutes at 30 degrees C after dissolving 10mg in 2ml (pH5.0) of 5mM acetic-acid buffer solutions. It is 0.1M phosphate buffer

solution about a cocktail. (pH6.5) G-sephadex 25 column which equilibrated was presented, and the joint reagent was removed.

(2) Antifungal antibody CA 3-2-12 acquired in the sulfhydryl-ized example 2 of an antifungal antibody 50micro [ of SPDP methanol solution of 2 double mol ] I was added after dissolving 10mg in 2ml 0.05MPBS(s) (pH7.3). It is after a reaction and 0.1M for 30 minutes at 30 degrees C. 50micro of DTT water solutions I is added, and it is the reduction back, Sephadex G-25 column given in (1) was presented, and the superfluous reagent was removed.

(3) Add slowly, stirring 8mg of sulfhydryl-ized antifungal produced by (2) to 8mg of maleimide-ized anti-APB antibodies obtained by production (1) of a bispecific antibody under ice-cooling, The overnight reaction was carried out. As a result of presenting S-sephacryl 200 column with a cocktail and carrying out separation removal of the unreacted antibody from a chemical bond bispecific antibody, about 7mg anti-APB-antifungal duplex singularity hybrid antibody was acquired.

(4) EIA given [ the bispecific antibody produced by the binding affinity (3) of a bispecific antibody ] in the example 3 of reference was presented, and the antibody dilution curve was produced. The result was as having been shown in drawing 5 . Consequently, the binding affinity strong against both mannan antigen of solid phase and APB antigen of the liquid phase was shown.

[0026]

---

[Translation done.]



**\* NOTICES \***

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

---

**DESCRIPTION OF DRAWINGS**

---

**[Brief Description of the Drawings]**

**[Drawing 1]** After making the antibody dilution curve (O) and this culture supernatant which offered and obtained the culture supernatant of the anti-APB antibody production mouse hybridoma ATB 1-114 produced by \*\*\*\*\* 1 for the example 1 of reference in EIA of a publication react with APB (25microg/(ml)) of isolation beforehand, (-) is shown, as a result of presenting EIA and obtaining.

**[Drawing 2]** The antibody dilution curve which offered and obtained the culture supernatant of the antifungal antibody production mouse hybridoma CA 3-2-12 produced by \*\*\*\*\* 2 for the example 2 of reference in EIA of a publication is shown.

**[Drawing 3]** The heating killed bacteria of CA fungus body is added to the 50 times many antifungal antibody production mouse hybridoma CA3-2 culture-supernatant [ as this ] diluent of -12 produced by \*\*\*\*\* 2, and the result of having offered and obtained the supernatant liquid for the example 2 of reference after the 1-hour reaction at the room temperature in EIA of a publication is shown.

**[Drawing 4]** The heating killed bacteria of 107 CAs [/ml ] fungus body is added to the culture supernatant of the antifungal antibody production mouse hybridoma CA 3-2-12 produced in the culture supernatant or example 2 of the anti-APB antibody production mouse hybridoma ATB 1-114 produced in the fresh culture medium and the example 1, and the result which was made to combine the 2nd antibody of an FITC indicator further after a 90-minute reaction at 37 degrees C, and was analyzed by FACS is shown.

**[Drawing 5]** The antibody dilution curve which offered and obtained the bispecific antibody produced in the example 4 for the example 3 of reference in EIA of a publication is shown.

**[Drawing 6]** The purification result of the anti-APB-antifungal bispecific



antibody ACT 1-1.18 given in example 3-(4) is expressed. namely, -- a hybrid antibody -- ACT -- one - 1.18 -- containing -- an antinode -- water -- a salting-out -- processing -- IgG -- a fraction -- acquiring -- further -- a mannan -- association -- a column -- having refined -- after -- DEAE - a column -- having offered -- a result -- expressing -- [ -- an example -- three - ( -- four -- ) -- reference -- ] .

[Drawing 7] To the purification hybrid antibody ACT 1-1.18 Candida The result which was made to combine the 2nd antibody of an FITC indicator, and was analyzed by FACS is shown after the reaction which added albicans TA formalin processing killed bacteria.

[Drawing 8] To the purification hybrid antibody ACT 1-1.18 Candida The result which was made to combine the 2nd antibody of an FITC indicator, and was analyzed by FACS is shown after the reaction which added toropicalis formalin processing killed bacteria.

[Drawing 9] To the purification hybrid antibody ACT 1-1.18 Candida krusei The result which was made to combine the 2nd antibody of an FITC indicator, and was analyzed by FACS is shown after the reaction which added formalin processing killed bacteria.

[Drawing 10] To the purification hybrid antibody ACT 1-1.18 Candida glabrata The result which was made to combine the 2nd antibody of an FITC indicator, and was analyzed by FACS is shown after the reaction which added formalin processing killed bacteria.

[Drawing 11] To the purification hybrid antibody ACT 1-1.18 Candida The result which was made to combine the 2nd antibody of an FITC indicator, and was analyzed by FACS is shown after the reaction which added albicans CaN formalin processing killed bacteria.

[Drawing 12] To the purification hybrid antibody ACT 1-1.18 The result which was made to combine the 2nd antibody of an FITC indicator, and was analyzed by FACS is shown after the reaction which added Candida parapsilosis formalin processing killed bacteria.

[Drawing 13] To the purification hybrid antibody ACT 1-1.18 Candida guilliermondii The result which was made to combine the 2nd antibody of an FITC indicator, and was analyzed by FACS is shown after the reaction which added formalin processing killed bacteria.

[Drawing 14] To the purification hybrid antibody ACT 1-1.18 Cryptococcus neoformans The result which was made to combine the 2nd antibody of an FITC indicator, and was analyzed by FACS is shown after the reaction which added formalin processing killed bacteria.

[Drawing 15] The hemolysis activity over the human erythrocyte of APB is shown [example 3-(6)].

[Drawing 16] The neutralization ability to the APB hemolysis activity of the purification hybrid antibody ACT 1-1.18 given in example 3-(4) is shown

[refer to example 3-(7)].

[Drawing 17] The enhancement ability to the APB antifungal activity of the purification hybrid antibody ACT 1-1.18 given in example 3-(4) is shown. namely, an APB/ACT1-1.18 immune-complex administration group ([example 3-(7 which compared -) in the drugs group non-prescribing a medicine for the patient and (control) (O), the APB monopharmacy group (\*\*), and the survival rate) -- ] .

[0027]

[Explanation of agreement]

(a) shows the analysis result of a fresh culture medium.

(b) The analysis result of the culture supernatant of the anti-APB antibody production mouse hybridoma ATB 1-114 produced in the example 1 is shown.

(c) The analysis result of the culture supernatant of the antifungal antibody production mouse hybridoma CA 3-2-12 produced in the example 2 is shown.

(A) shows the IgG fraction before presenting a mannan column.

(B) shows the bypassing fraction of a mannan column.

(C) shows [refer to example 3-(4)]. [ which shows the antibody elution pattern of the elution fraction of a mannan column ]

---

[Translation done.]

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-199894

(43)公開日 平成5年(1993)8月10日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 21/08		8214-4B		
C 1 2 N 5/18				
// A 6 1 K 39/395	L	8413-4C		
	ADU H	8413-4C		
C 1 2 N 15/06				

審査請求 未請求 請求項の数7(全 18 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平3-196810	(71)出願人	000002934 武田薬品工業株式会社 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号
(22)出願日	平成3年(1991)8月6日	(72)発明者	岩佐 進 京都府綴喜郡田辺町大住ヶ丘1丁目21番地の2
(31)優先権主張番号	特願平2-219629	(72)発明者	原田 薫 大阪府泉大津市東助松町2丁目6番6号
(32)優先日	平2(1990)8月20日	(72)発明者	清田 剛 大阪府吹田市山田南50番1号 武田薬品吹田寮内
(33)優先権主張国	日本(JP)	(74)代理人	弁理士 岩田 弘 (外4名)

(54)【発明の名称】 二重特異性抗体および抗体含有薬剤

(57)【要約】

【目的】 毒性の強い抗真菌剤の毒性を軽減し、かつ真菌に対する選択性を持たせることにより真菌症治療上有用な抗真菌剤を提供する。

【構成】 真菌および抗真菌剤に対する特異性を有する二重特異性抗体を作製し、該抗体に抗真菌剤を免疫結合させた抗真菌免疫複合体を提供する。

【効果】 本発明の抗真菌免疫複合体により、強毒性の抗真菌剤の毒性を軽減し、かつ抗真菌剤の真菌選択性を向上させることができる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】二重特異性を有するハイブリッド・モノクローナル抗体であって、二重特異性の一方が真菌に対するものであり、他方が抗真菌剤に対するものである抗体。

【請求項2】抗真菌剤がポリエン系抗生物質である請求項1記載の二重特異性抗体。

【請求項3】ポリエン系抗生物質がアムホテリシンB類である請求項2記載の二重特異性抗体。

【請求項4】請求項1記載の抗体に、抗真菌剤を免疫結合させてなる抗真菌免疫複合体。

【請求項5】抗真菌剤がポリエン系抗生物質である請求項4記載の抗真菌免疫複合体。

【請求項6】ポリエン系抗生物質がアムホテリシンB類である請求項5記載の抗真菌免疫複合体。

【請求項7】請求項1記載のハイブリッド・モノクローナル抗体を産生するポリドーマ。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は二重特異性を有するハイブリッド・モノクローナル抗体に関する。さらに詳しくは二重特異性の一方が抗真菌剤に対し、他方が真菌、特に真菌の細胞壁糖蛋白あるいは多糖類に対するハイブリッド・モノクローナル抗体(以下、ハイブリッドMoAbと略記することがある)およびそれを産生するポリドーマに関する。本発明はまた、上記ハイブリッドMoAbに抗真菌剤を免疫結合させてなる抗真菌免疫複合体を真菌に特異的に結合させ、真菌に致死的作用を与えることを可能とする真菌症治療剤に関する。

## 【0002】

【従来の技術】真菌による疾患は一般に難治とされ、しかも近年この真菌症が急速に増加する傾向にある。例えば臓器移植患者、抗生物質やステロイド剤の多量長期投与患者、エイズ患者、さらには白血病や癌の末期患者の深在性真菌症の合併が数多く報告されている。これらの疾患には(1)イミダゾール誘導体であるケトコナゾール、ミコナゾール、(2)フルオロピリミジン誘導体であるフルサイトシン、そして(3)ポリエン系抗生物質であるアムホテリシンB(以下、APBと略記することがある)、トリコマイシン、ナイスタチンなどが用いられている。上記(1)および(2)に挙げたイミダゾール誘導体やフルオロピリミジン誘導体などは比較的毒性は弱いとされているものの十分な薬効が得られず、また上記(3)に挙げたAPBは真菌の細胞膜に著明な変化を惹起し強い抗菌性を示すが、毒性が強いため大量投与あるいは長期の連続投与ができないなどの欠点を有していた。一方、癌細胞を選択的に殺す薬物として抗癌抗体と抗癌剤との複合体が作製され、“ミサイル療法剤”として臨床応用されつつある。これらの複合体は、抗癌抗体が癌細胞表面上の癌特異抗原と結合し、次いでその標的癌細胞を抗癌剤が

傷害するというもので、抗癌剤の標的腫瘍部位への効率的運搬により劇的な副作用の軽減および抗癌効果の増強をもたらすものである。このような抗癌-薬物複合体の作製に関し、薬物を抗体に化学結合させる方法では、1)薬物の薬理活性が低下する、2)品質の一定した複合体の作製が困難である、あるいは3)使用しうる薬物が限定される、などの欠点があった。そこで癌細胞と抗癌剤との双方に結合能を有する二重特異性抗体が作製され、かかる抗体の出現により薬効の高い、品質の一定した抗体-薬物複合体の作製が可能となった。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】毒性が非常に強いために、十分な有効量を用いえない抗真菌剤の毒性を軽減し、弱毒性でかつ効率的に真菌を溶解または除去可能な抗真菌剤を提供する。

## 【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは抗真菌剤に関わる上記の諸問題を解決するため、最近の蛋白結合技術あるいは細胞融合技術の進歩により著しく発展した二重特異性抗体を用いた新しいタイプの抗真菌剤について鋭意検討し、抗真菌-抗薬物二重特異性抗体を開発し、それを用いた副作用のきわめて少ない薬効の高い抗体-薬物複合体を作製した。すなわち、本発明は二重特異性を有するハイブリッドMoAbであって、二重特異性の一方が抗真菌剤に対し、他方が標的真菌(例えば、鵝口瘡カンジダ(*Candida albicans*: CA)の細胞壁糖蛋白など)に対する二重特異性抗体およびそれを産生するポリドーマに関するものである。また、本発明はかかる二重特異性抗体に抗真菌剤を免疫結合させてなる真菌症治療剤に関するものである。本発明における真菌としては、例えば(1)コクシジオイデス属菌(例、*Coccidioides immitis* など)などの藻菌類、(2)アスペルギルス属菌(例、*Aspergillus terreus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans* など)、スコブラリオブシス属菌(例、*Scopulariopsis blochii* など)などの子囊菌類、(3)クリプトコックス属菌(例、*Cryptococcus neoformans* など)、カンジダ属菌(例、*Candida albicans* など)、トリコスボロン属菌(例、*Trichosporon cutaneum*, *Trichosporon beigeli* など)などのクリプトコックス科菌、モニリア科菌(例、*Sporotrichum schenckii*, *Acremonium potronii*, *Blastomyces dermatitidis*, *Blastomyces brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum* など)、デマチウム科菌(例、*Hormodendrum pedrosoi* など)などの不完全菌類、(4)小孢子菌属(例、*Microsporum audouinii*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypsum* など)、白癬菌属(例、*Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton interdigitale*, *Trichophyton pedis*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton coccineum*, *Trichophyton schoenleinii*, *Trichophyton ferrugineum*, *Trichophyton violaceum*, *Trichophyton concentricum*



など)、表皮菌属(例、Epidermophyton floccosum など)などの皮膚糸状菌などの哺乳動物(例、マウス、ラット、ネコ、ウサギ、イヌ、ブタ、ウマ、ウシ、サル、ヒトなど)に対して病原性を示す真菌などが挙げられるが、なかでも不完全菌類が好ましく、さらにクリプトコックス科菌が好ましく、とりわけカンジダ属菌(好ましくは Candida albicans)が好ましく用いられる。

【0005】本発明で用いられる抗真菌剤としては、代表的なものとして例えば、(1)グリセオフルビン、ポリエン系抗生物質(例、ナイスタチン、アムホテリシンB、トリコマイシン、ビマリシンなど)、バリオチン、シカニン、ピロールニトリン、エキノカンジン-アクレアシン群抗生物質(例、エキノカンジンB、アクレアシンAなど)、バブラカンジン群抗生物質(例、バブラカンジンBなど)、アムブルチシンなどの抗生物質、(2)スチルバミジン系化合物(例、スチルバミジン・イセチオネート、2-ヒドロキシスチルバミジン・イセチオネートなど)、ジামタゾール系化合物(例、ジামタゾール・ジヒドロクロライドなど)、アルキルオキシベンツアミド系化合物(例、2-n-ヘキシルオキシベンツアミドなど)、ベンツイミダゾール系化合物(例、クロルイミダゾールなど)、チオカルバミン酸系化合物(例、トルナフテート、トルシクレートなど)、3-ヨードプロバギル系化合物(例、ハロプロギン、メチオジンなど)、フルオロピリジン系化合物(例、フルサイトシン など)、 $\omega$ -ヨードアセチレン性脂肪酸系化合物(例、フェニル11-ヨード-10-ウンデシノエートなど)、イミダゾール系化合物(例、クロトリマゾール、ミコナゾール、エコナゾール、イソコナゾール、スルコナゾール、ブトコナゾール、チオコナゾール、ビホナゾール、クロコナゾール、オキシコナゾール、ケトコナゾールなど)、N-ヒドロキシピリドン系化合物(例、シクロピロキソールアミンなど)、トリアゾール系化合物(例、ターコナゾール、ICI 153,066、ビブナゾール、フルコナゾール、イトラコナゾールなど)、アリルアミン系化合物(例、ナフチフィン、タービナフィンなど)、トリヨードアリル系化合物(例、ME-1207 など)などの合成化合物などが挙げられるが、なかでもポリエン系抗生物質が好ましく用いられる。

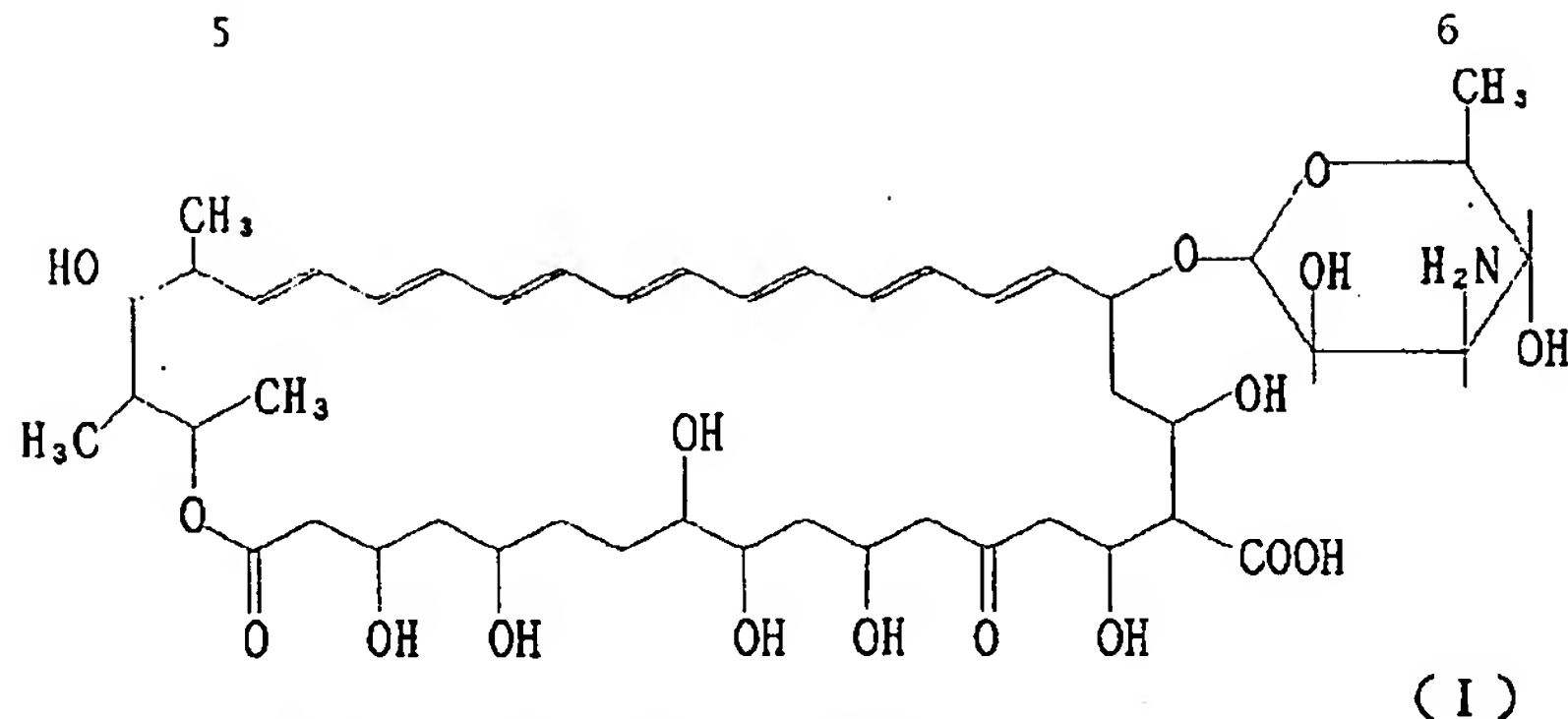
【0006】本発明に用いられるポリエン系抗生物質としては、テトラエン抗生物質(例、アムホテリシンAなど)、ペンタエン抗生物質(例、ビマリシン、ペンタマイシンなど)、ヘキサエン抗生物質(例、ナイスタチンなど)、ヘプタエン抗生物質(例、アムホテリシンB、カン

ジシジン、ペリマイシン、ハアマイシン、トリコマイシンなど)などがあげられるが、好ましくはヘプタエン抗生物質であり、なかでもアムホテリシンB類(好ましくはアムホテリシンB)が好ましく用いられる。ここでアムホテリシンB類とは、アムホテリシンB、その誘導体およびこれらの塩を含むものである。アムホテリシンBの誘導体としては、例えば(1)N-アルキル誘導体(例、metaphosin, etaphosin, propamphosin, butamphosin など[Kasumov, Kh. M. et.al, Antibiotiki(Moscow), 29(7), 513(1984)],あるいはN,N,N-トリメチルアムホテリシンBなど)、N-アシル誘導体(例、N-アセチルアムホテリシンBなど)、O-シリル誘導体(例、13,14-アンヒドロアムホテリシンB[EP公開第350164号公報]など)、N-アミノアシル誘導体(例、N-グリシルアムホテリシンB、N-リシルアムホテリシンB、N-D-オルニチルアムホテリシンBなど)、N-アルキルアミノアシル誘導体(例、N,N-ジメチルグリシルアムホテリシンBなど)、エナミン誘導体、アミジン誘導体などあるいはN-チオプロピオニルアムホテリシンB、N-フルクトシルアムホテリシンB、N-グルコシルアムホテリシンB、1-(ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミドアムホテリシンBなどおよび(2)上記誘導体あるいはアムホテリシンBのエステル(例、アムホテリシンBメチルエステルなどのアルキルエステルなど)などがあげられる。また、これらの塩としては、Na塩、HCl塩、N-メチルグルカミン塩などがあげられる。

【0007】本発明の二重特異性を有するハイブリッドMoAb作製にあたっては、原料の一つとして抗真菌剤に対するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマが用いられるが、かかるハイブリドーマ、例えば抗APBモノクローナル抗体産生ハイブリドーマは下記の方法で作製される。まずAPB(下記式(I)参照)もしくはその誘導体を動物に接種し、抗APB抗体の産生を促す。この場合、通常APBもしくはその誘導体をそのまま免疫原として用いたのでは高力価の抗体産生を惹起しえないので、APBの有するカルボキシル基あるいはアミノ基を介してキャリア蛋白である牛血清アルブミン(以下、BSAと略記することがある)、キーホール・リンベット・ヘモシアニン(以下、KLHと略記することがある)、あるいはチログロブリンなどに結合させ免疫原として用いる。

【化1】





Amphotericin B (m.w. 924)

免疫動物としては、一般に哺乳類例えばウサギ、ラット、マウス、モルモットなどが用いられるが、MoAb 製造の場合にはマウスが特に好ましく用いられる。接種方法としては、通常実施される方法に従えばよく、例えばマウスに1回1～100  $\mu$ g、好ましくは10～25  $\mu$ gを等容量(0.1 ml)の生理食塩水およびフロイントの完全アジュバントで乳化して、背部、腹部の皮下あるいは腹腔内に2～3週毎に3～6回接種する方法がとられる。

【0008】これらの免疫動物、例えばマウスから抗体価の高い個体を選び、最終免疫3～5日後に脾臓および/あるいはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させる。融合操作は既知の方法に従い実施でき、融合促進剤としてはポリエチレングリコール(以下、PEGと略記することがある)やセンダイウイルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。骨髓腫細胞としてはNS-1、P3U1、SP2/0など、特にP3U1が好ましく用いられる。例えば脾臓細胞と骨髓腫細胞との好ましい比率は1:1～10:1で、これに分子量1,000～9,000のPEGが10～80%の濃度で添加され、20～37℃、好ましくは30～37℃で3～10分インキュベートするのが良い。抗APBマウスモノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できる。例えば、ヒト血清アルブミン(以下、HSAと略記することがある)を結合させたAPBをマイクロプレートに吸着させ、固相化抗原を作製する。次いでハイブリドーマ培養上清をこれらの抗原感作マイクロプレートに添加し、プレートに結合した抗APB特異抗体を西洋ワサビ・ペルオキシダーゼ(以下、HRPと略記することがある)標識した抗マウス免疫グロブリン抗体により検出する酵素免疫測定法(以下、EIAと略記することがある)により培養上清中の抗体価を測定する。HAT(ヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン)添加培地で選別、育種された抗体活性陽性のハイブリドーマは直ちにクローニングに供されるが、通常これは限界希釈法などで容易に実施される。クローン化されたハイブリドーマ培養上清の抗体価を上記の方法で測定し、安定的に力価の高い抗体を産生するハイブリドーマを選択し、目的とするモノクローナルな抗APB特異抗体産生ハイブリ

ドーマを取得することができる。以上のような製造法に従って作製した抗APBマウスモノクローナル抗体(IgG<sub>1</sub>,  $\kappa$ 鎖)産生ハイブリドーマの例として、後述の実施例1に示したマウスハイブリドーマATB1-114が挙げられる。一方、原料の一つである抗真菌モノクローナル抗体産生ハイブリドーマは下記の方法で作製される。

【0009】標的とする真菌の抗原としては、例えばカンジダ症の病因菌である *Candida albicans* (以下、CAと略記することがある)の加熱死菌やホルマリン処理死菌そのもの、あるいはそれら死菌の細胞壁糖蛋白あるいは多糖類(マンナン)が用いられる。後者のマンナン抗原は公知の方法に従って精製され[A. Cassone ら: *J. Med. Microbiol.*, 27, 233 (1988)]、通常下記の方法により調製される。1)菌体(CA)をオートクレーブ処理し(120℃, 90分)遠心分離後、上清液にフエリング液を添加する。2)得られた沈殿を遠心分離操作により、採取後、塩酸を加えて溶解しメタノール酢酸混液に添加する。3)遠心分離後、沈渣にメタノールを加え洗浄する。さらに遠心分離し沈渣に少量のエーテルを加えて室温で風乾する。マウスへの免疫操作においては、例えば加熱死菌あるいはホルマリン処理死菌の場合、一回に $10^6 \sim 10^8$ 個/匹、好ましくは $0.5 \sim 2 \times 10^7$ 個をリン酸食塩緩衝液(以下、PBSと略記することがある)に懸濁して、2～3週毎に3～8回接種する方法が取られる。マンナン抗原の免疫は前述したAPB-キャリア蛋白複合体の場合と同様にして実施される。以下、これらの免疫動物から採取した抗体産生細胞と骨髓腫細胞との融合操作は、APBについて述べた方法と同様にして実施できる。

【0010】抗真菌モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できる。例えば、加熱死菌あるいはホルマリン処理死菌をマイクロプレートに播き45℃で乾燥後、ホルマリンで固定したものを固相抗原として用いる。あるいは前述の方法で得られたマンナン抗原を10～100  $\mu$ g/mlの濃度でマイクロプレートに感作し抗原固相を得る方法も用いられる。以上のようにして作製された抗原感作マイクロプレ

ートにハイブリドーマ培養上清を添加し、プレートに結合した抗真菌抗体をHRP標識第2抗体で検出するEIAにより培養上清中の抗体価を測定する。抗体活性陽性のハイブリドーマは直ちに前述の方法によりクローニングに供され、真菌に結合能を有するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを取得することができる。以上のような製造法に従って作製した抗真菌マウスモノクローナル抗体(IgG<sub>1</sub>, κ鎖)産生ハイブリドーマの例として、後述の実施例2に示したマウスハイブリドーマCA3-2-12が挙げられる。

【0011】本発明の二重特異性を有するハイブリッドMoAbを作製するにはいくつかの方法がある。1つは化学的方法で、この場合抗真菌特異MoAbと抗真菌剤に対するMoAbを共有結合させる。また別法として、抗真菌特異MoAbおよび抗真菌剤に対するMoAbをそれぞれ産生する2種のハイブリドーマを細胞融合し、ハイブリッド・ハイブリドーマ(例、テトラオーマなど)を作製し目的の二重特異性抗体を作製する方法がある。一定した高い品質の抗体を大量に収率良く得る手段としては後者のハイブリッド・ハイブリドーマ法が好ましく用いられる。2種のMoAbを化学的に結合させるために、抗体分子中に存在している置換基、例えばアミノ基、カルボキシル基、ヒドロキシル基またはスルフヒドリル基などを利用することができる。例えば、(1)一方の抗体の反応性アミノ基と他方の反応性カルボキシル基とを水溶性カルボジイミド試薬〔例、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド、1-シクロヘキシル-3-(2-モルホリノエチル)-カルボジイミド-p-トルエンスルホネートなど〕を用いて水性溶媒中で脱水縮合させる、(2)一方の抗体の反応性アミノ基をN-ヒドロキシスクシミドの活性エステル〔例、p-マレイミドメチルシクロヘキサン-1-カルボキシル-N-ヒドロキシスクシミドエステル、N-(ε-マレイミドカプロイロキシ)スクシミドエステルなど〕と反応させマレイミド化したのち、i)他方の抗体をジチオスレイトール(以下、DTTと略記することがある)で還元した抗体、あるいはii)他方の抗体にN-スクシミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(以下、SPDPと略記することがある)でスルフヒドリル基を導入した抗体、あるいはiii)他方の抗体をペプシン処理後還元して得られるFab'画分のスルフヒドリル基とチオエーテル結合させる、(3)2種の抗体双方の反応性アミノ基をスクシンジアルデヒドやグルタルアルデヒドなどのジアルデヒド試薬を用いて結合させる、(4)2種の抗体をDTTで還元あるいはSPDPでスルフヒドリル基を導入し、再酸化によりヘテロダイマーを作製する、(5)2種の抗体をいずれもペプシン処理後還元し、Fab'としたのち再酸化しFab'ヘテロダイマーを作製する、などの方法がある。またこれらの方法を種々組み合わせ、2種の抗体活性をできるだけ損なわずに効率良く目

的のヘテロダイメリックな二重特異性抗体を作製する報告があり〔M. J. Glennieら：ジャーナル・オブ・イムノロジー(J. Immunol.), 139, 2367(1987)；北川常広：有機合成化学, 42, 283(1984)〕、本発明の二重特異性ハイブリッドMoAbの作製に利用できる。以上のような結合反応終了後、二重特異性抗体結合物はセファデックスG100もしくはG200、セファロース6Bもしくは4B、ウルトロゲルAcA44もしくは34、セファクリルS200などのゲル濾過クロマトグラフィーにより精製または分取できる。あるいは抗原結合カラムを用いるアフィニティークロマトグラフィーを組み合わせることにより選択的な分取も可能である。

【0012】本発明の二重特異性を有するハイブリッドモノクローナル抗体を産生するハイブリッドハイブリドーマの作製にはいくつかの手法があり〔例、新本洋士ら：蛋白質・核酸・酵素, 33, 217(1988)など〕、いずれの方法を用いてもよいが例えば、①前記したHAT抵抗性の抗真菌剤に対するMoAbを産生するハイブリドーマを、5-ブロモデオキシウリジン(以下、BrdUと略記することがある)添加の培養液に段階的に馴化させ、チミジンキナーゼ欠損株をクローン化しHAT感受性とする。同様にHAT抵抗性の抗真菌特異MoAb産生ハイブリドーマを8-アザグアニン(以下、AZGと略記することがある)耐性とし、ヒポキサンチン-グアニン-ホスホリボシルトランスフェラーゼ欠損株をクローン化しHAT感受性とする。次いで常法に従い両者を融合して得られるテトラオーマをHAT添加培地で選別後、真菌および抗真菌剤の両者に結合能を有するハイブリッドMoAbを分泌するテトラオーマをクローン化する、②抗真菌特異MoAb産生ハイブリドーマをフルオレセイン・イソチオシアネート(以下、FITCと略記することがある)で標識し、もう一方の抗真菌剤に対するMoAbを産生するハイブリドーマをテトラメチル・ロダミン・イソチオシアネート(以下、TRITCと略記することがある)で標識後、常法に従い両者を融合する。得られた細胞懸濁液をフルオレセイン・アクティベイティッド・セルソーター(以下、FACSと略記することがある)に供し、FITCの緑色およびTRITCの赤色の蛍光を同時に有するテトラオーマを選別しクローン化するなどの方法が挙げられる。また両親株のマーカーを全く逆にして使用し、テトラオーマを選別しクローンすることも可能である。これらの操作における細胞融合に当ってはセンダイウイルス、PEGなどの融合促進剤あるいは電気刺激などの方法が用いられる。好ましくはPEGが用いられ、以下にその一例を挙げるが、もちろんこの方法に限定されるものではない。すなわち、分子量約1,000~9,000、濃度約10~80%等のPEGが用いられ、処理時間は約0.5~30分であるが、好ましい条件の一例として、約35~55

%のPEG 6,000を約4~10分間、37℃で細胞と接触させ、効率よく融合させることができる。

【0013】ポリドーマ(例、テトラオーマなど)の選択は、上記のHAT添加培地などで実施できるが、このため8-AZG、6-チオグアニン(6-TG)あるいは5-BrdUなどの薬剤馴化法により、それぞれの薬物耐性株が取得される。また新しいマーカーの融合細胞への導入により、種々の選択培地が用いられる。このような例として、ネオマイシンやハイグロマイシンB添加培地などが挙げられる〔B. Sugden ら：モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー(Mol. Cell. Biol.), 5, 410(1985)〕。さらに前記したように、異った蛍光色素で標識したハイブリドーマを融合し、FACSで二重標識されたハイブリッド・ハイブリドーマをソーティングする方法もある〔L. Karavajew ら：ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッズ(J. Immunol. Methods), 96, 265(1987)〕。ハイブリッドMoAb産生ポリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できる。例えば、1)前述した抗真菌特異モノクローナル抗体産生ハイブリドーマと抗真菌剤に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングのためのEIAの併用、2)真菌あるいは真菌由来の糖蛋白または多糖類を結合したマイクロプレートに被検培養上清を添加し、次にHRP標識した抗真菌剤-HSA複合体を加えて二重特異性を有するハイブリッドモノクローナル抗体検出のためのEIA、あるいは抗真菌特異マウスモノクローナル抗体と異なるサブクラスに属する抗真菌剤に対するマウスモノクローナル抗体を用いる場合は、3)真菌あるいは真菌由来の糖蛋白または多糖類結合マイクロプレートに被検培養上清を添加し、次にHRP標識した該抗マウスIgGサブクラス特異抗体を加えて二重特異性モノクローナル抗体を検出するEIA、およびこれらの変法などを適宜組み合わせて用いることができる。

【0014】ハイブリッドMoAb活性陽性のポリドーマは直ちにクローニングに供されるが、これは通常限界希釈法などで容易に実施される。クローン化されたポリドーマの培養上清については、上記の方法でその抗体価を測定し、安定的に力価の高い抗体を産生するポリドーマを選択することにより、目的とするモノクローナルなハイブリッドMoAb産生ポリドーマを取得することができる。上記した本発明のポリドーマの培養は通常、液体培地中、または動物の腹腔内(例えば、マウス等哺乳動物の腹腔内)で公知の方法により実施できる。培養液および腹水中の抗体の精製については公知の生化学的手法を組み合わせて用いることによりできる。例えば、細胞培養液もしくは腹水を遠心分離し、上清を取り出し、塩析(通常は硫酸アンモニウムもしくは硫酸ナトリウムを用いる)を実施する。得られたタンパク沈殿物を適当な溶液に溶解し、透析後カラムクロマトグラフィー(イオン交換カラム、ゲルろ過カラム、プロテインAカラム、ヒ

ドロキシアパタイトカラム等)に付し、目的とする抗体を分離精製することができる。以上のような分離精製操作により、例えば1リットルの培養上清からタンパク重量比で80%以上の純度のハイブリッドMoAbを約1~5mg得ることができる。また、20mlの腹水液からは同様の抗体が3~10mg得られる。以上のようにして得られた二重特異性を有するハイブリッドMoAbは蛋白質として均一であり、公知免疫グロブリン製剤と同様哺乳動物に安全に投与することができる。また、蛋白分解酵素(ペプシンなど)処理などにより、真菌および抗真菌剤に対する結合能を保持するF(ab')<sub>2</sub>断片などを得ることができ、これらは本発明のハイブリッドMoAbと同様の目的で用いることができる。以上のような製造法に従って作製したハイブリッド抗体産生ポリドーマの例として、後述の実施例3に示したテトラオーマACT1-1.18が挙げられる。なお、本発明のハイブリッドMoAbを産生するポリドーマとして、抗真菌特異MoAb産生ハイブリドーマと抗真菌剤に対するMoAbを産生するハイブリドーマとのテトラオーマの例を挙げたが、一方のMoAbを産生するハイブリドーマと他方のMoAbを産生する細胞とのトリオーマあるいはそれぞれのMoAbを産生する細胞をエプスタイン・バー・ウイルスなどにより不滅化後、細胞融合して得られるハイブリドーマなどであっても、本発明のハイブリッドMoAbを産生するものであれば、上記テトラオーマと同様の目的で用いることができる。また、これらのポリドーマがマウスIgG MoAbを産生する場合には、該二重特異性ハイブリッドMoAbの抗原認識部位を含む可変領域あるいは超可変領域をコードするDNAを取得し、これに遺伝子操作技術〔Z. Stepkowski ら：プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・サイエンス・ユーエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 85, 4852(1988)〕を用いてヒトIgGの定常領域、さらにはフレーム・ワーク領域をコードする遺伝子を結合させ、マウス-ヒトキメラ抗体あるいはヒト型化抗体を作製することもできる。かかるキメラ抗体はヒトへの投与に際し、抗原性が小さいため有利に用いられる。

【0015】本発明の二重特異性ハイブリッドMoAbあるいは抗真菌剤と該二重特異性ハイブリッドMoAbとから作製される選択的な抗真菌免疫複合体を用いる真菌症治療法においては、幾つかの方法が用いられる。例えば、1)本発明のハイブリッドMoAbを予め真菌症患者に投与し、患者体内で増殖する真菌に結合させるべく十分な時間経過後に、抗真菌剤、(例えばAPB)を投与する、2)該ハイブリッドMoAbと抗真菌剤とを同時に真菌症患者に投与する。あるいは、3)予め該ハイブリッドMoAbと抗真菌剤とを反応させ未反応の抗真菌剤を分離後、得られた選択的抗真菌免疫複合体を真菌症患者に投与する、などの方法が挙げられる。さらに、本発明の抗真菌免疫複合体は2種以上(例えば、抗真菌抗APBハ



イブリッドMoAb-APB免疫複合体と抗真菌抗フルサイトシンハイブリッドMoAb-フルサイトシン免疫複合体)を組み合わせ用いてもよく、また1種または2種以上の毒性の低い抗真菌剤(例、フルサイトシンなど)と本発明の抗真菌免疫複合体とを併用してもよい。本発明のハイブリッドMoAbを含む抗真菌免疫複合体は、必要により公知の方法例えばメンブレンフィルター等による過除菌操作の後に、それ自体あるいは適宜の薬理学的に許容され得る担体、賦形剤、希釈剤などと混合し、注射剤などとして製剤化して、哺乳動物(例、マウス、ラット、ネコ、ウサギ、イヌ、ブタ、ウマ、ウシ、サル、ヒトなど)に投与し、例えばカンジダ症、クリプトコッカス症、アスペルギルス症あるいはムーコル症(好ましくは、カンジダ症)などの治療に用いることができる。

【0016】本発明の抗真菌免疫複合体の投与量は、対象となる疾患、症状あるいは投与ルートなどによって異なるが、例えばカンジダ症の成人患者に静脈投与する場合、ハイブリッドMoAbとして1日当り約1~100mg/kg、好ましくは約2~30mg/kg、抗真菌剤として1日当りAPBでは約0.02~1.5mg/kg、好ましくは約0.04~0.5mg/kgとなるように投与するのがよい。以上のようにして用いることにより本発明の抗真菌\*

\*免疫複合体は、標的真菌に対して特異的に結合可能で、また抗真菌剤、特にAPBのような強い毒性を有する化合物の副作用を、それと反応するハイブリッド抗体との免疫結合により中和し、効率的に真菌を溶解または除去できる、きわめて優れた真菌特異性を持つ真菌治療薬を提供する。このようにAPBの持つ強力な抗真菌活性が標的部位に特異的に発揮され、しかも標的部位到達以前においては完全にその毒性が中和されていることは、従来の化学療法剤と比べて際だった特性である。より少ない投与量でより大きな治療効果を挙げることができるため従来は毒性が非常に強いため、十分な有効量を用い得なかった抗真菌剤を、本発明のハイブリッドMoAbと併用することにより、その毒性を大幅に軽減し、かつ該抗真菌剤による選択的な真菌傷害が可能となる。

【0017】

【実施例】以下に参考例・実施例により本発明を具体的に説明するが、これらが本発明の範囲を制限するものではないことは言うまでもない。なお、参考例および実施例で用いられている動物細胞は、以下の〔表1〕に示すように寄託が行なわれている。

〔表1〕

動物細胞	(IFO) IFO No.	(FRI) FERM No.
マウスハイブリドーマ ATB1-114	50253	3069
マウスハイブリドーマ CA3-2-12	50252	3070
マウスハイブリッドハイブリドーマ ACT1-1.18	50343	12365

IFO：財団法人発酵研究所(大阪)

FRI：通商産業省工業技術院

微生物工業技術研究所

【0018】参考例1 抗アムホテリシンB抗体測定用EIA

(1)固相抗原の調製

N-( $\gamma$ -マレイミドブチリルオキシサクシニミド)(以下、GMBSと略記することがある)でマレイミド化したAPBを、予めSPDPとDTTとで修飾還元したHSAに添加し、APB-HSA複合体を作製した。HSA1モル当り7.6個のAPB分子が導入された。セファデックスG-25カラムで未反応のAPBおよび反応試薬を除去し、次いでこの蛋白複合体50 $\mu$ g/mlを96穴マイクロプレートに100 $\mu$ l/ウェルの割合で添加し固相抗原を調製した。

(2)アッセイ法

被検マウスハイブリドーマ培養上清100 $\mu$ lを上記の

抗原感作プレートに添加し、室温で2時間反応させた。0.05%Tween 20含有20mMリン酸食塩緩衝液(pH 7.3；以下、PBS-Twと略記する)でプレートを十分に洗浄後、HRP標識ウサギ抗マウスIgG抗体を添加し、さらに室温で2時間反応させた。洗浄後、酵素基質としてオルソーフェニレンジアミンおよびH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を含有する0.1Mクエン酸緩衝液を各ウェルに加え、室温で酵素反応を実施した。1N硫酸で反応停止後、マルチスキャン(フロー社製)を用いて波長492nmで発色色素量を測定した。

【0019】参考例2 抗真菌抗体測定用EIA

(1)固相抗原の調製

CAの菌体をオートクレーブ処理(120℃、90分)後、上清液にフエーリング液を攪拌しながら添加した。得られた沈渣に3N-塩酸を加えて溶解後、メタノール-酢酸(8:1)混液に滴下した。遠心分離後、沈渣をメタノールで数回洗浄し、さらにエーテルを少量加えてメ



タノールを除去し室温で感作することにより、CA細胞壁由来マンナン抗原を取得した。このマンナン抗原液100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ を96穴マイクロプレートに100  $\mu\text{l}$ /ウエルの割合で添加し固相抗原を調製した。

#### (2)アッセイ法

参考例1-(2)に記載の方法に従い実施した。

#### 【0020】参考例3 抗APB-抗真菌二重特異性抗体測定用EIA

(1)標識抗原の調製 参考例1-(1)で作製したAPB-HSA複合体をビオチン活性化エステル(ベクター社製)を用いてビオチン化し、EIAに供した。

#### (2)アッセイ法

参考例2-(1)で作製したマンナン抗原感作マイクロプレートに二重特異性抗体含有検液100  $\mu\text{l}$ を添加し、室温で2時間反応させた。PBS-Twでプレートを洗浄後、(1)で作製したビオチン化APB-HSA複合体を添加し室温で1時間反応させた。さらにPBS-Twでプレートを十分に洗浄後、アビジン標識HRPを添加し、室温で1時間反応させた。固相に結合した酵素活性を参考例1-(2)に記載の方法で測定した。

#### 【0021】参考例4 マンナン・カラムの作製

参考例2-(1)で調製したマンナン抗原を過ヨウ素酸ナトリウムで酸化・開裂し、生じたアルデヒド基をEAH-セファロース4B(ファルマシア社製)のアミノ基と反応・結合させた。次いでシアノ化ホウ素ナトリウムで還元し、マンナン結合セファロースを作製した。

#### 【0022】実施例1 マウス抗APB抗体産生ハイブリドーマの作製

##### (1)免疫原の調製

GMBsでマレイミド化したAPB 1.8mgを、予めSDPとDTTとでスルフヒドリル化したBSA 10mgに加え、5℃で一夜反応させた。セファデックスG-25カラムで精製後、APB結合量を紫外吸収法で測定したところ、BSA 1モル当り6.8個のAPB分子が導入された。

##### (2)免疫

APB-BSA複合体1mg/ml生理食塩水溶液に等量のフロイント完全アジュバントを加え、マウス(0.1mg/0.2ml/マウス)の背部および腹部皮下への免疫を開始した。追加免疫は免疫原に等量のフロイント不完全アジュバントを加えて、2-3週毎に4回接種し実施した。4回の追加免疫10日後に、参考例1に記載のEIAで最大の血清抗体価を示した個体について、同じAPB-BSA複合体(200  $\mu\text{g}/0.1\text{ml}$ 生理食塩水/マウス)を静脈内投与した。

##### (3)細胞融合

最終免疫後3日で脾臓を摘出し、脾臓細胞懸濁液を常法により調製した(約 $10^8$ 個)。次いでマウス骨髓腫細胞(P3U1) $2 \times 10^7$ 個を添加し、PEG6000を用いてケーラーとミルスタインの方法[ネーチャー(Natur

e), 256, 495(1975)]に準じて細胞融合に供した。融合終了後、細胞混液をヒポキサンチン・アミノプテリンおよびチミジンを含む、いわゆるHAT培地中に懸濁し、10日間培養した。以後は、親細胞の選択が終了次第、HAT培地からアミノプテリンを除いたHT培地に代え培養を続けた。

#### (4)ハイブリドーマの選択およびクローニング

細胞増殖の見られたウエルについてハイブリドーマ培養上清を採取し、参考例1に記載のEIAで抗体価を測定した。特に結合能の強い抗体を産生するハイブリドーマについて限界希釈法によるクローニングを実施し、抗APBモノクローナル抗体産生マウスハイブリドーマATB1-114を得た。本ハイブリドーマの産生する抗体のサブクラスはIgG<sub>1</sub>( $\kappa$ 鎖)であった。

#### (5)抗体の精製

予め0.5ml鉱油を腹腔内投与したハイブリッド・ヌードマウス(Jcl:AF-nu)に $10^7$ 個/匹のマウスハイブリドーマATB1-114を腹腔内投与した。約10-20日後に腹水の貯溜が見られたのでそれを採取し、45%飽和硫酸アンモニウムで塩析してIgG画分を得た。PBS(pH7.5)で透析後、プロテインAカラムに供し、pH2.9のグリシン・塩酸緩衝液で溶出し精製抗体を得た。腹水10mlより約34mgの抗APB特異マウスMoAb ATB1-114を取得した。

#### (6)抗体の性状(1)

上記(4)で取得したマウスハイブリドーマATB1-114の培養上清を参考例1に記載のEIAに供し、抗体希釈曲線を作製した。得られた結果は図1に示した通りであった。その結果、抗体ATB1-114は3,000倍以上に希釈した低抗体濃度においてもAPBに対する強い結合能を示した。

#### (7)抗体の性状(2)

上記(4)で取得したマウスハイブリドーマATB1-114の培養上清を遊離のAPB(25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )と室温で1時間反応させ、次いでその混液を参考例1に記載のEIAに供した。得られた結果は図1に示した通りであった。その結果、遊離のAPBによる競合的結合阻害が見られ、上記の抗体ATB1-114がAPBに特異的であることが示された。

#### 【0023】実施例2 抗真菌抗体産生ハイブリドーマの作製

##### (1)免疫原の調製

免疫原として加熱死菌およびマンナン抗原の2種の抗原を用いた。加熱死菌はCAの菌体を100℃で2時間処理後、生理食塩水で洗浄することにより作製した。マンナン抗原は参考例2-(1)に示した方法で作製した。

##### (2)免疫

加熱死菌 $10^8$ 個/mlPBS懸濁液に等量のフロイント完全アジュバントを加えて、マウス( $10^7$ 個/0.2ml/マウス)の背部および腹部皮下に免疫した。3週間後

に同量の加熱死菌をフロイント不完全アジュバントと共に免疫した。次いで2週間隔で、等量のフロイント不完全アジュバントに懸濁したマンナン抗原(100  $\mu$ g/0.2 ml/マウス)を2-3回免疫した。10日後に、参考例2に示したEIAで最大の血清抗体価を示した個体について、同じマンナン抗原液(100  $\mu$ g/0.1 ml/マウス)を静脈内投与した。

### (3)細胞融合

実施例1-(3)に記載の方法に従い実施した。

### (4)ハイブリドーマの選択およびクローニング

参考例2に記載のEIAによりハイブリドーマ培養上清の抗体価を測定し、抗体陽性ウエルを実施例1-(4)に記載の方法に従いクローニングに供した。その結果、マンナン抗原およびCA菌体に強い結合能を示す抗真菌抗体産生マウスハイブリドーマCA3-2-12を得た。本ハイブリドーマにより産生される抗体のサブクラスはIgG<sub>1</sub>( $\kappa$ 鎖)であった。

### (5)抗体の精製

実施例1-(5)に記載の方法に従い、ハイブリッド・ヌードマウスを用いて腹水化した。さらにプロテインAカラムにより抗体IgG画分を得た。腹水10 mlより約29 mgの抗真菌特異MoAb CA3-2-12を取得した。

### (6)抗体の性状(1)

上記(4)で取得したマウスハイブリドーマCA3-2-12の培養上清を、参考例2に記載のEIAに供し抗体希釈曲線を作製した。得られた結果は図2に示した通りであった。その結果、マンナン抗原への強い結合能を有することが示された。

### (7)抗体の性状(2)

上記(6)に記載のハイブリドーマ培養上清に $3 \times 10^6 - 5 \times 10^7$ 個/mlの加熱死菌を添加し室温で1時間反応させた。遠心分離後、その上清を参考例2に記載のEIAに供した。得られた結果は図3に示した通りであった。その結果、菌体による抗体の吸収が見られ、上記の抗真菌抗体が菌体表面の細胞壁マンナン抗原に対するものであることが示された。

### (8)抗体の性状(3)

上記(6)に記載のハイブリドーマ培養上清に $10^7$ 個/mlのCA菌体懸濁液を添加し、37°Cで90分間反応させた。遠心分離操作により菌体を洗浄後、FITC標識ウサギ抗マウスIgG抗体を添加し4°Cで60分間反応させた。再び菌体を洗浄後、PBSに懸濁しFACSにより解析した。得られた結果は図4に示した通りであった。その結果、新鮮培地および抗APB抗体産生マウスハイブリドーマATB1-114培養上清ではCA菌体は全く蛍光染色されないが、抗真菌抗体産生マウスハイブリドーマCA3-2-12培養上清では菌体表面が強く蛍光染色され、菌体表面細胞壁に強く結合している抗体が存在することが示された。

【0024】実施例3 抗APB-抗真菌二重特異性を

## 有するハイブリッド・モノクローナル抗体の製造(1)

### (1)細胞融合

実施例2で取得した抗真菌抗体産生マウスハイブリドーマCA3-2-12および実施例1で取得した抗APB抗体産生マウスハイブリドーマATB1-114を、それぞれ0.5  $\mu$ g/ml FITCおよび1.5  $\mu$ g/ml TRITC含有イスコフ-ハムF12混合培地で37°C、30分間インキュベートし、蛍光染色する。次いで、LSM溶液(和光純薬工業K.K.販売)を添加し死細胞を除去したのち、両ハイブリドーマを1:1の割合で混ぜ、PEG6000を用いて細胞融合する。37°Cで2時間インキュベート後、FACSに供することによりフルオレセインおよびローダミンで二重染色された細胞25,000個を分取し、次にフィーダーとしてマウス胸腺細胞を $5 \times 10^5$ 個/ウエル播種した96穴マイクロプレートに、上記の二重染色細胞を10個/ウエルの割合で播種し培養する。

### (2)ハイブリッド・ハイブリドーマの選択およびクローニング

融合後1-2週で細胞増殖のみられたウエルの培養上清を参考例1および2に記載のEIA、さらに参考例3に記載の二重特異性抗体測定用EIAに供して抗体活性を測定する。高いハイブリッド抗体活性を示したウエルについて限界希釈法によるクローニングを実施し、目的の二重特異性抗体産生テトラオーマを取得する。このようにして得られた二重特異性抗体産生マウスハイブリッドハイブリドーマACT1-1.18により産生される二重特異性抗体のサブクラスは、IgG<sub>1</sub>( $\kappa$ 鎖)であった。

### (3)ハイブリッド抗体の精製(1)

予め0.5 ml鉍油を腹腔内投与したハイブリッド・ヌードマウスに $10^7$ 個/マウスのテトラオーマを腹腔内接種する。約17-23日後に腹水の貯溜がみられるのでそれを採取し、45-50%飽和硫酸アンモニウムで塩析してIgG画分を得る。PBS(pH7.5)で透析後、SPB-HSA結合セルロフエインカラムに供し、pH2.9の0.2 Mグリシン・塩酸緩衝液で溶出する。酸溶出画分をPBSで透析後、さらにヒドロキシ・アパタイトカラムを用いる高速液体クロマトグラフィーにより本発明の抗APB-抗真菌二重特異性を有するハイブリッド抗体を取得する。

### (4)ハイブリッド抗体の精製(2)

(3)と同様の方法により得られたIgG画分をPBS(pH7.5)で透析後、参考例4で作製したマンナン結合セファロースカラムに供しPBSで十分に洗浄後、MAPS-II溶出緩衝液(バイオラッド社製)で溶出した。溶出画分をPBSで透析後、さらにDEAE-5PWカラム(7.5  $\times$  75 mm; トーソー(株))を用いる高速液体クロマトグラフィーにより本発明の抗APB-抗真菌二重特異性抗体ACT1-1.18を取得した。得られた結

10

20

30

40

50

果は〔図6〕に示した通りであった。参考例3に示した方法で二重特異性抗体活性を示す単一のピークが得られた(図6-(C)参照)。腹水20mlより約12mgのハイブリッド抗体を取得した。

#### (5)ハイブリッド抗体の性状(1)

上記(4)に記載の精製ハイブリッド抗体ACT1-1.18に、 $10^7$ 個/mlのホルマリン処理病原性酵母菌体懸濁液を添加し、37℃で1時間反応させた。遠心分離操作により菌体を洗浄後、実施例2-(8)の要領でハイブリッド抗体の反応性をFACSを用いて解析した。得られた結果は図7~14に示した通りであった。その結果、ハイブリッド抗体ACT1-1.18は2種の *Candida albicans* TAおよびCaNにはいずれも強く反応するが、他の *Candida* 5種には反応しなかった。また、*Cryptococcus neoformans* に対してはわずかに反応性を示した。

#### (6)ハイブリッド抗体の性状(2)

ハイブリッド抗体ACT1-1.18のAPBに対する毒性中和能を測定するため、APB溶血反応を利用した〔吉岡史郎：真菌誌，29，127(1988)〕。すなわち、各種濃度のAPBに洗浄ヒト赤血球 $3 \times 10^6$ 個を添加し37℃で10分間インキュベートした。遠心分離後、上清液のヘモグロビン濃度を540nmで測定した。得られた結果は図15に示した通りであった。APBは20 $\mu$ g/ml以上の濃度で強い溶血活性を示した。次にAPB60 $\mu$ g/mlに種々の濃度の精製ハイブリッド抗体ACT1-1.18を添加し、37℃で30分間インキュベートした。次いで洗浄ヒト赤血球 $3 \times 10^6$ 個を添加し、上記と同じ要領で溶血反応を実施し、上清に遊離したヘモグロビン濃度を測定した。結果は図16に示した通りであった。抗体1-2mg/mlで60 $\mu$ g/mlのAPBを完全に中和した。この結果から、本発明のハイブリッド抗体が強い毒性中和能を有することが分かった。

#### (7)ハイブリッド抗体の性状(3)

CDF<sub>1</sub>マウス(♀：18-22g)に *Candida albicans* TA 8 $\times$ LD<sub>50</sub>単位(LD<sub>50</sub>：50%致死量)の0.2ml生理食塩水懸濁液を静脈注射した。感染2日後にAPB(40 $\mu$ g/ml)もしくはAPB/二重特異性抗体免疫複合体(モル比1：1、APBとして40 $\mu$ g/ml)の生理食塩水溶液0.5mlを腹腔内投与し、生存率を30日まで経過観察した。1群5匹のマウスを用いて得られた結果は図17に示した通りであった。APB単剤投与群においても薬剤非投与群よりも生存日数の延長が見られたが、免疫複合体投与群ではさらにその改善が観察された。

#### 【0025】実施例4 抗APB-抗真菌二重特異性を有するハイブリッド・モノクローナル抗体の製造(2)

##### (1)抗APB抗体のマレイミド化

実施例1で取得した抗APB抗体ATB1-114 1 50

0mgを5mM酢酸緩衝液(pH5.0)2mlに溶解後、2倍モルのN-( $\epsilon$ -マレイミドカプロイロキシ)スクシミドエステルジメチルホルムアミド溶液50 $\mu$ lを添加し30℃で20分間反応させた。反応混液を0.1Mリン酸緩衝液(pH6.5)で平衡化したセファデックスG-25カラムに供し結合試薬を除去した。

##### (2)抗真菌抗体のスルフヒドリル化

実施例2で取得した抗真菌抗体CA3-2-12 10mgを2mlの0.05MPBS(pH7.3)に溶解後、2倍モルのSPDPメタノール溶液50 $\mu$ lを添加した。30℃で30分間反応後、0.1M DTT水溶液50 $\mu$ lを添加し還元後、(1)に記載のセファデックスG-25カラムに供して過剰の試薬を除去した。

##### (3)二重特異性抗体の作製

(1)で得たマレイミド化抗APB抗体8mgに、(2)で作製したスルフヒドリル化抗真菌8mgを氷冷下攪拌しながらゆっくりと添加し、一夜反応させた。反応混液をセファクリルS-200カラムに供し、未反応の抗体を化学結合二重特異性抗体から分離除去した結果、約7mgの抗APB-抗真菌二重特異性ハイブリッド抗体を取得した。

##### (4)二重特異性抗体の結合能

(3)で作製した二重特異性抗体を参考例3に記載のEIAに供し抗体希釈曲線を作製した。結果は図5に示した通りであった。その結果、固相のマナン抗原および液相のAPB抗原の両者に強い結合能を示した。

【0026】

##### 【図面の簡単な説明】

【図1】は実施例1で作製した抗APB抗体産生マウスハイブリドーマATB1-114の培養上清を参考例1に記載のEIAに供して得た抗体希釈曲線(O)及び該培養上清を予め遊離のAPB(25 $\mu$ g/ml)と反応させたのち、EIAに供して得た結果(●)を示す。

【図2】は実施例2で作製した抗真菌抗体産生マウスハイブリドーマCA3-2-12の培養上清を参考例2に記載のEIAに供して得た抗体希釈曲線を示す。

【図3】は実施例2で作製した抗真菌抗体産生マウスハイブリドーマCA3-2-12の培養上清50倍希釈液にCA菌体の加熱死菌を添加して室温で1時間反応後、その上清を参考例2に記載のEIAに供して得た結果を示す。

【図4】新鮮培地、実施例1で作製した抗APB抗体産生マウスハイブリドーマATB1-114の培養上清または実施例2で作製した抗真菌抗体産生マウスハイブリドーマCA3-2-12の培養上清に $10^7$ 個/mlのCA菌体の加熱死菌を添加して37℃で90分反応後、さらにFITC標識第2抗体を結合させFACSにより解析した結果を示す。

【図5】実施例4で作製した二重特異性抗体を参考例3に記載のEIAに供して得た抗体希釈曲線を示す。

【図6】実施例3-(4)記載の抗APB-抗真菌二重特



異性抗体ACT1-1.18の精製結果を表す。すなわち、ハイブリッド抗体ACT1-1.18を含有する腹水液の塩析処理によりIgG画分を取得し、さらにマンナン結合カラムで精製したのちDEAE-カラムに供した結果を表す〔実施例3-(4)参照〕。

【図7】精製ハイブリッド抗体ACT1-1.18に *Candida albicans* TAホルマリン処理死菌を添加した反応後、FITC標識第2抗体を結合させFACSにより解析した結果を示す。

【図8】精製ハイブリッド抗体ACT1-1.18に *Candida toropicalis*ホルマリン処理死菌を添加した反応後、FITC標識第2抗体を結合させFACSにより解析した結果を示す。

【図9】精製ハイブリッド抗体ACT1-1.18に *Candida krusei*ホルマリン処理死菌を添加した反応後、FITC標識第2抗体を結合させFACSにより解析した結果を示す。

【図10】精製ハイブリッド抗体ACT1-1.18に *Candida glabrata*ホルマリン処理死菌を添加した反応後、FITC標識第2抗体を結合させFACSにより解析した結果を示す。

【図11】精製ハイブリッド抗体ACT1-1.18に *Candida albicans* CaNホルマリン処理死菌を添加した反応後、FITC標識第2抗体を結合させFACSにより解析した結果を示す。

【図12】精製ハイブリッド抗体ACT1-1.18に *Candida parapsilosis*ホルマリン処理死菌を添加した反応後、FITC標識第2抗体を結合させFACSにより解析した結果を示す。

【図13】精製ハイブリッド抗体ACT1-1.18に *Candida guilliermondii*ホルマリン処理死菌を添加し \*

た反応後、FITC標識第2抗体を結合させFACSにより解析した結果を示す。

【図14】精製ハイブリッド抗体ACT1-1.18に *Cryptococcus neoformans*ホルマリン処理死菌を添加した反応後、FITC標識第2抗体を結合させFACSにより解析した結果を示す。

【図15】APBのヒト赤血球に対する溶血活性を示す〔実施例3-(6)〕。

【図16】実施例3-(4)に記載の精製ハイブリッド抗体ACT1-1.18のAPB溶血活性に対する中和能を示す〔実施例3-(7)参照〕。

【図17】実施例3-(4)に記載の精製ハイブリッド抗体ACT1-1.18のAPB抗真菌活性に対する増強能を示す。すなわち、APB/ACT1-1.18免疫複合体投与群(●)を、薬剤非投与群(コントロール)(○)およびAPB単剤投与群(□)と生存率において比較した〔実施例3-(7)〕。

【0027】

【符合の説明】

(a)は新鮮培地の解析結果を示す。

(b)実施例1で作製した抗APB抗体産生マウスハイブリドーマATB1-114の培養上清の解析結果を示す。

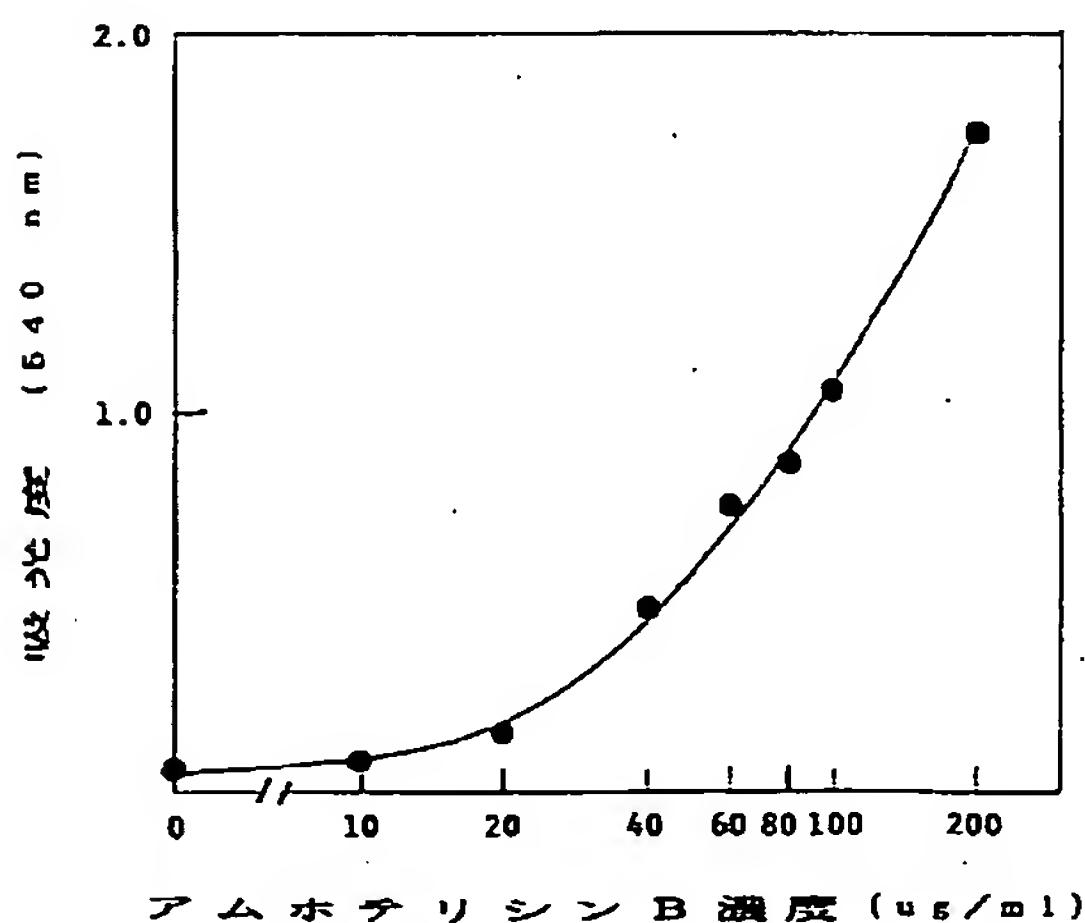
(c)実施例2で作製した抗真菌抗体産生マウスハイブリドーマCA3-2-12の培養上清の解析結果を示す。

(A)はマンナンカラムに供する前のIgG画分を示す。

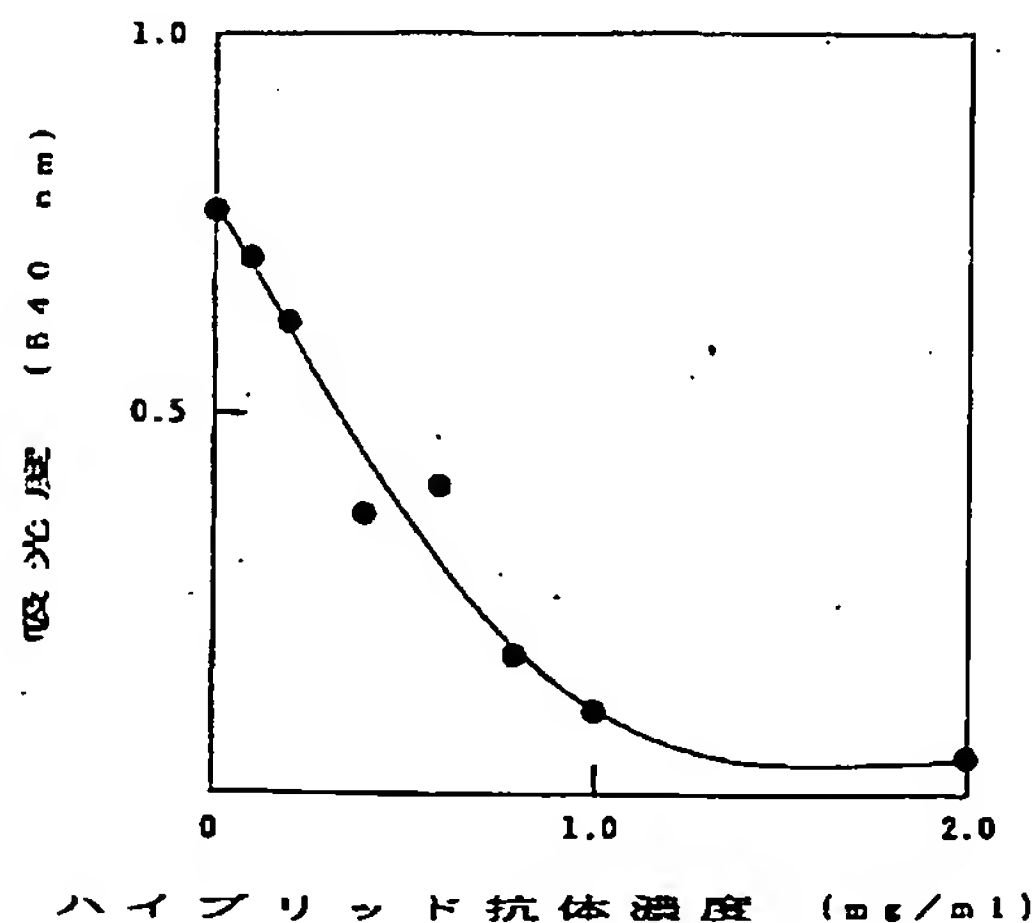
(B)はマンナンカラムの素通り画分を示す。

(C)はマンナンカラムの溶出画分の抗体溶出パターンを示す〔実施例3-(4)参照〕を示す。

【図15】

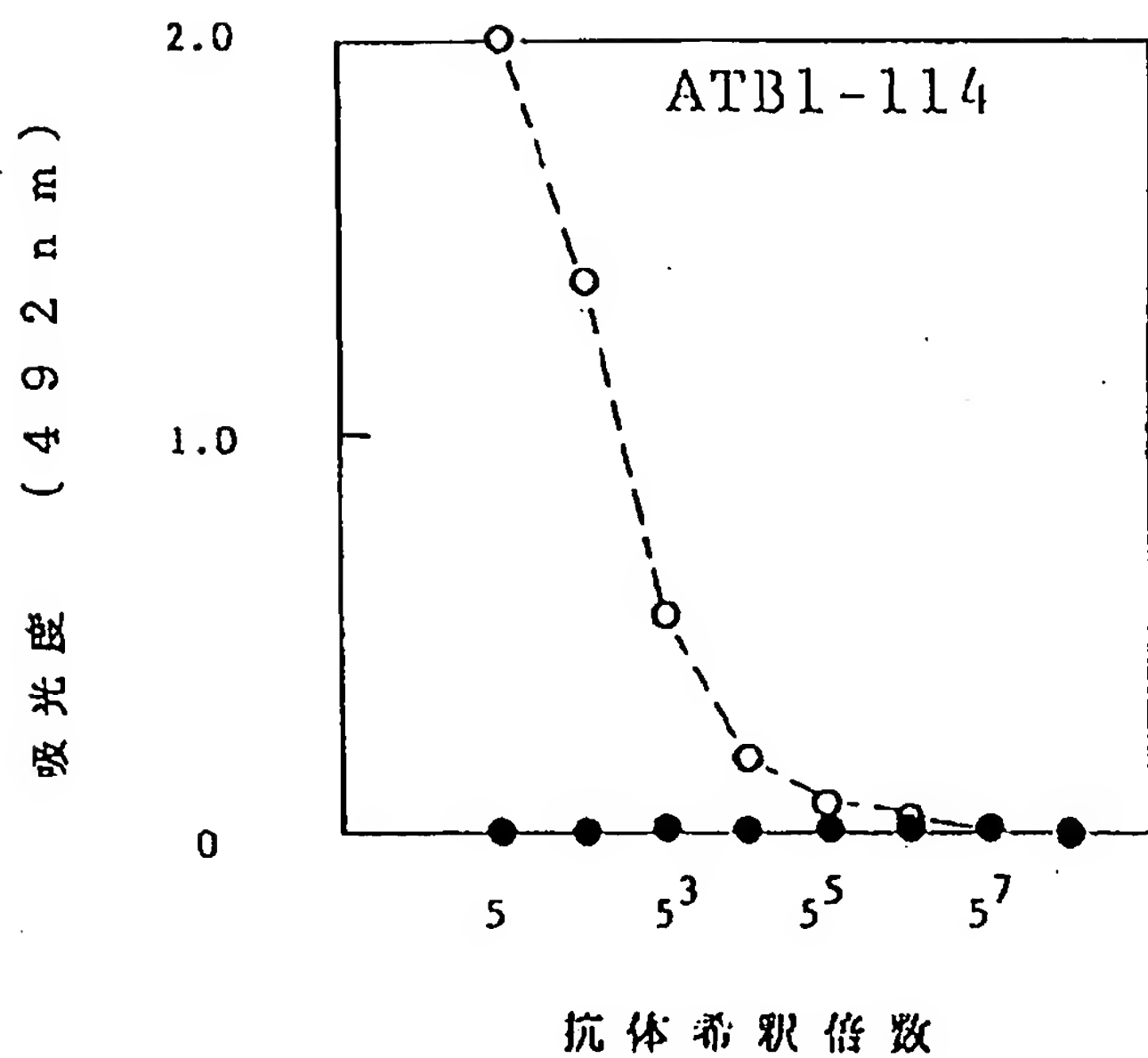


【図16】

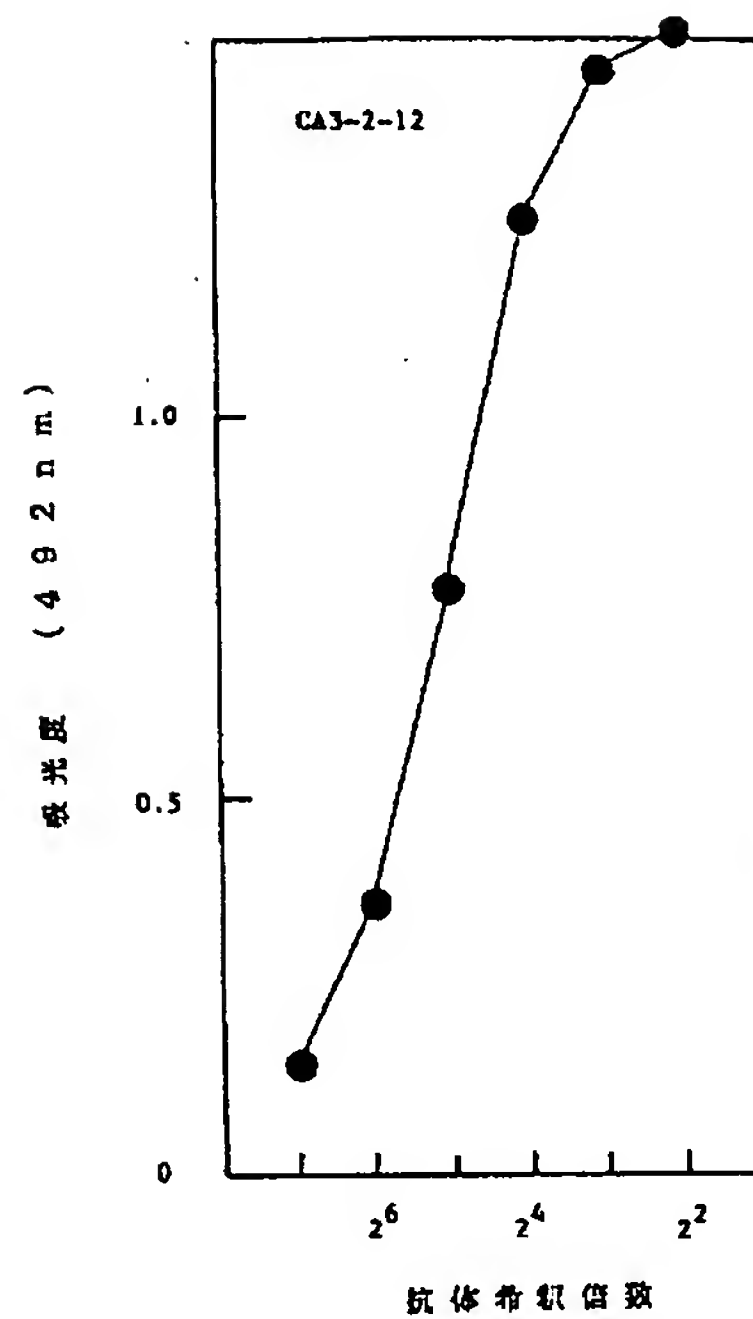




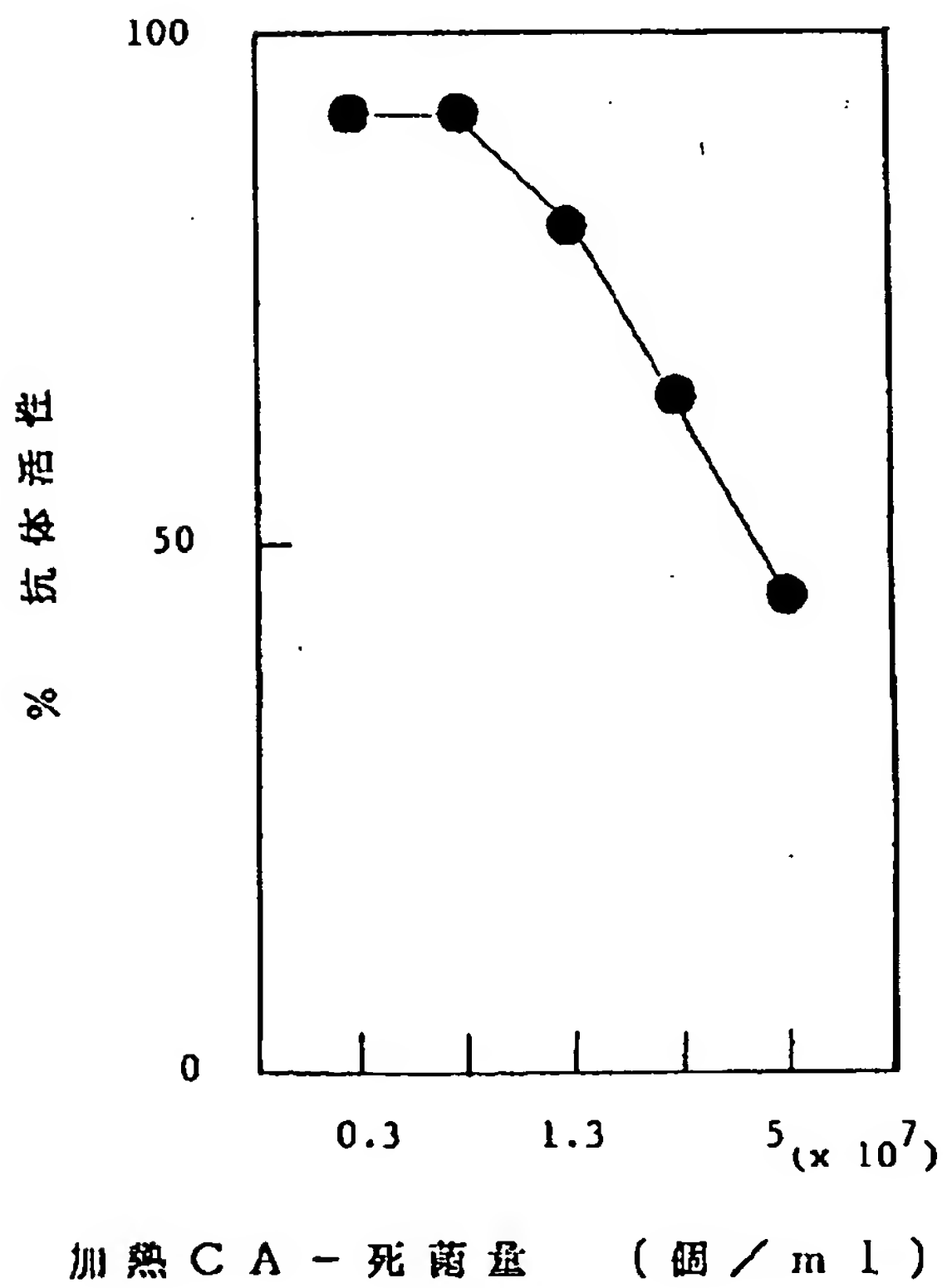
【図1】



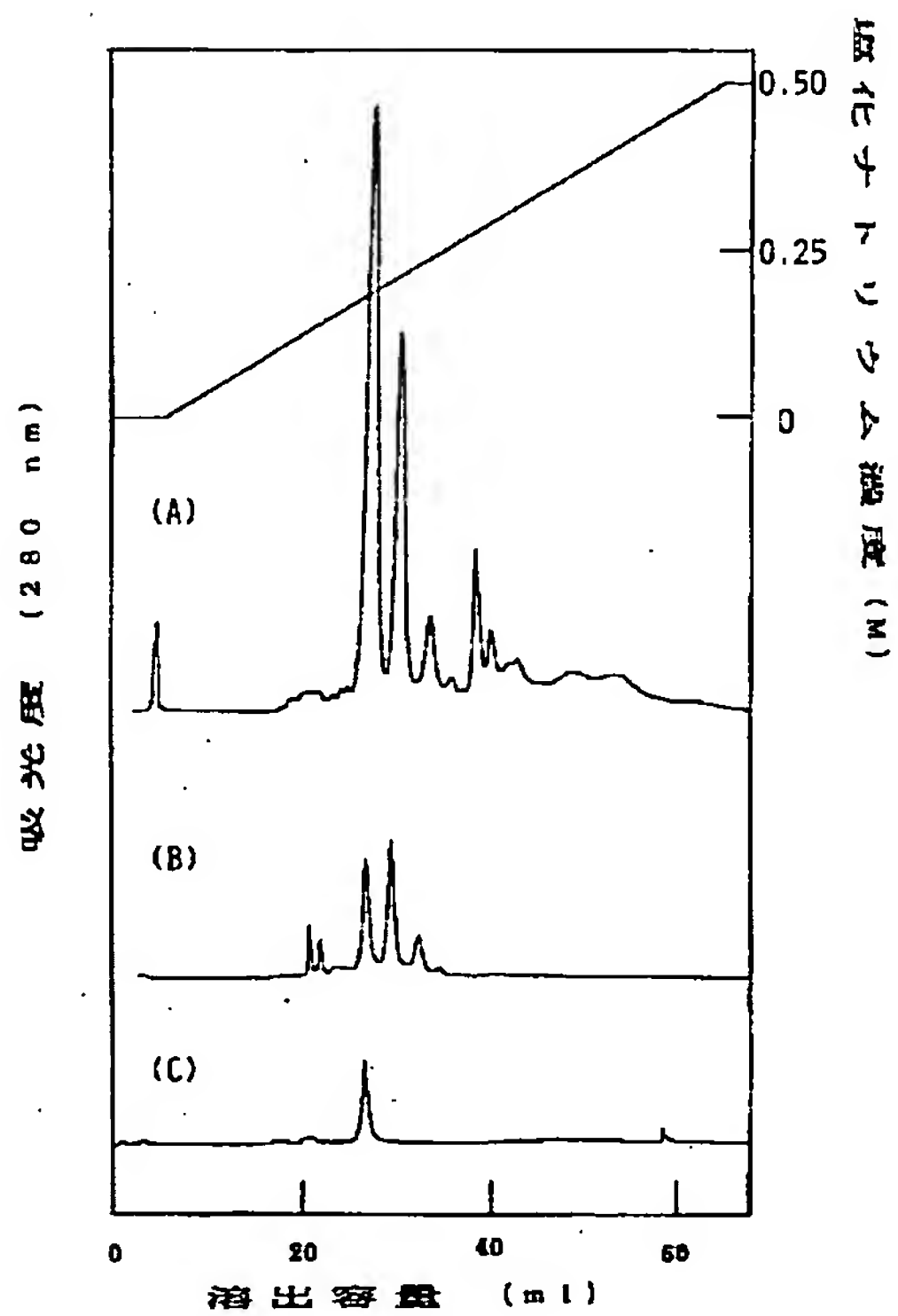
【図2】



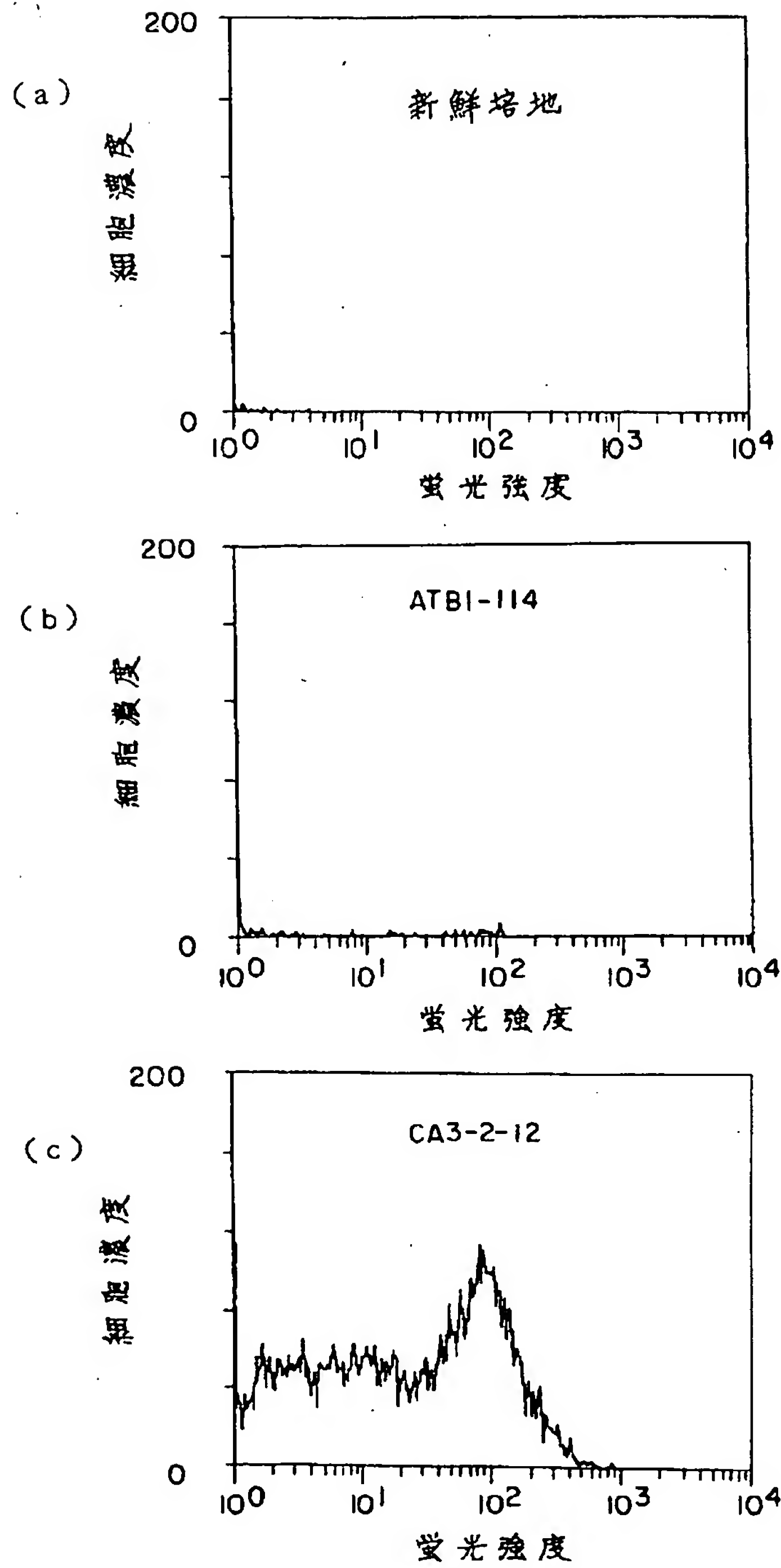
【図3】



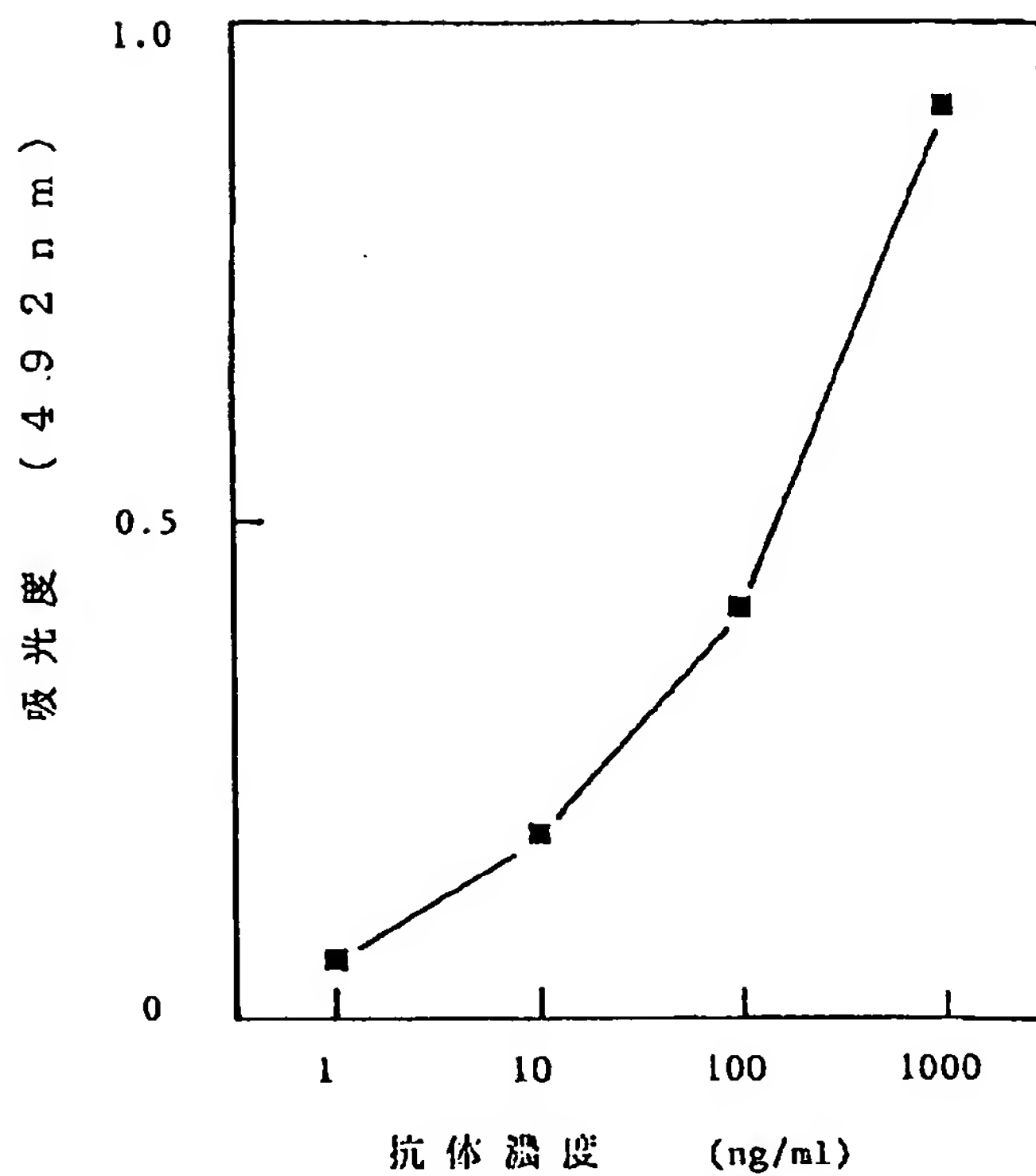
【図6】



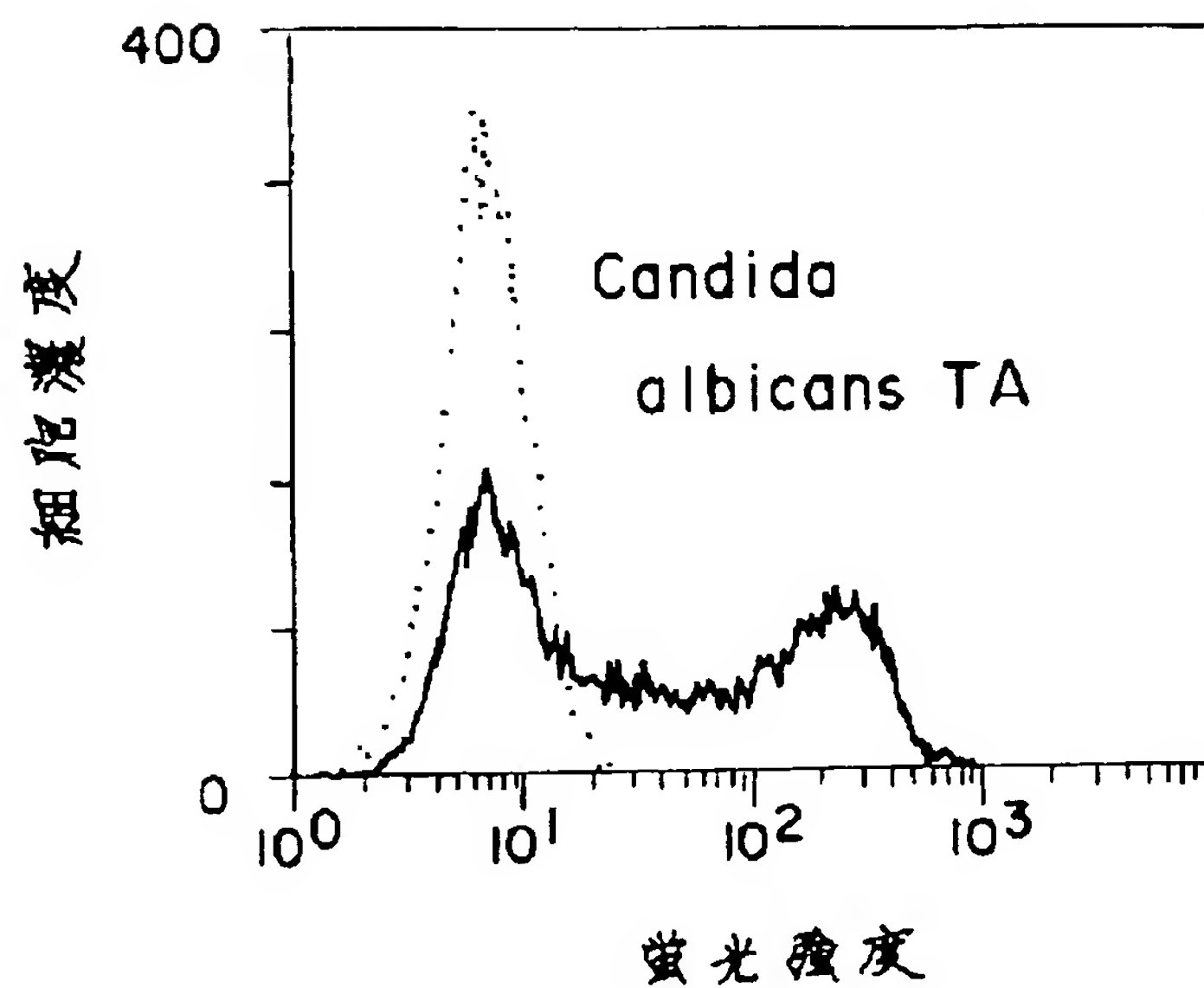
【図4】



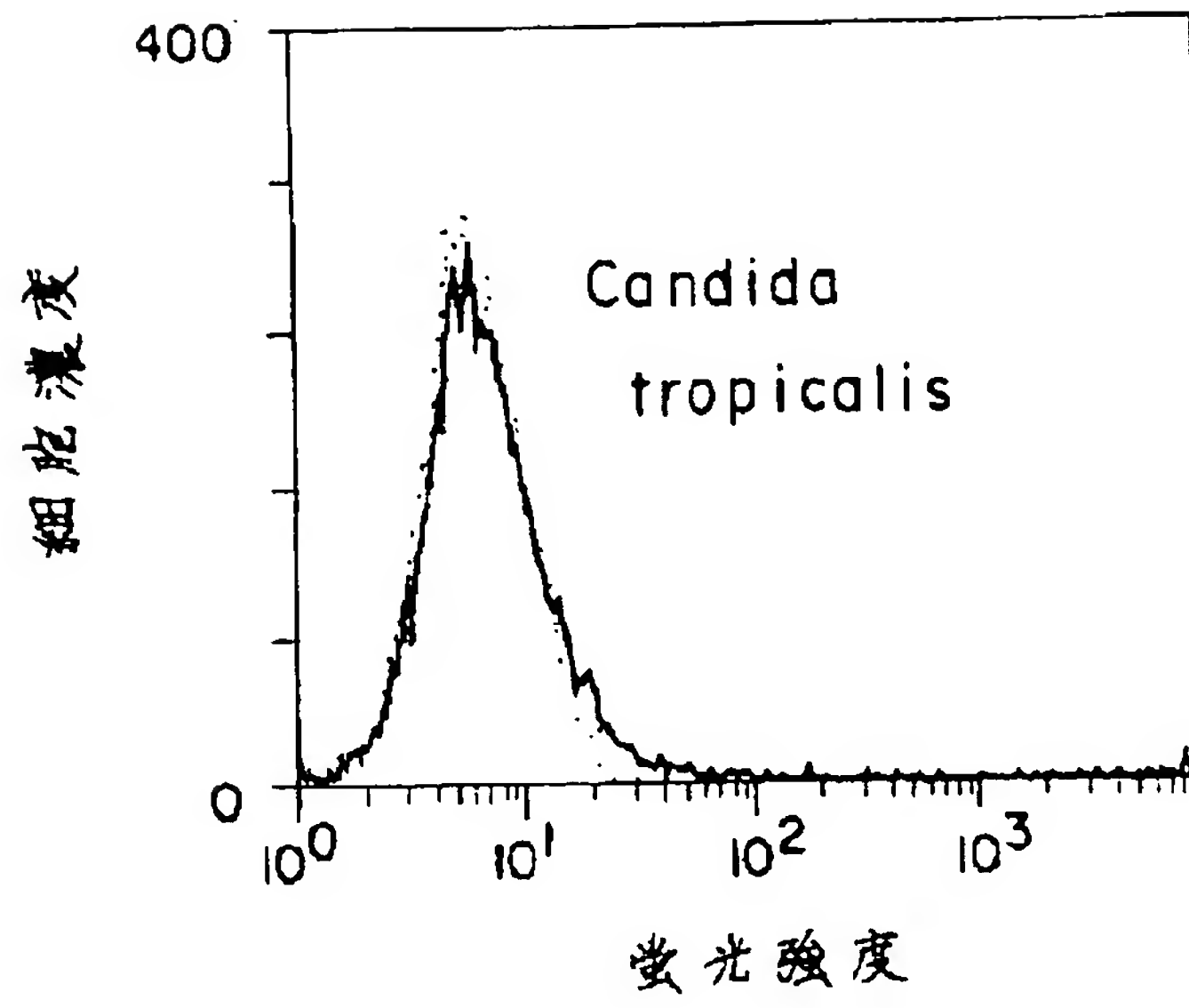
【図5】



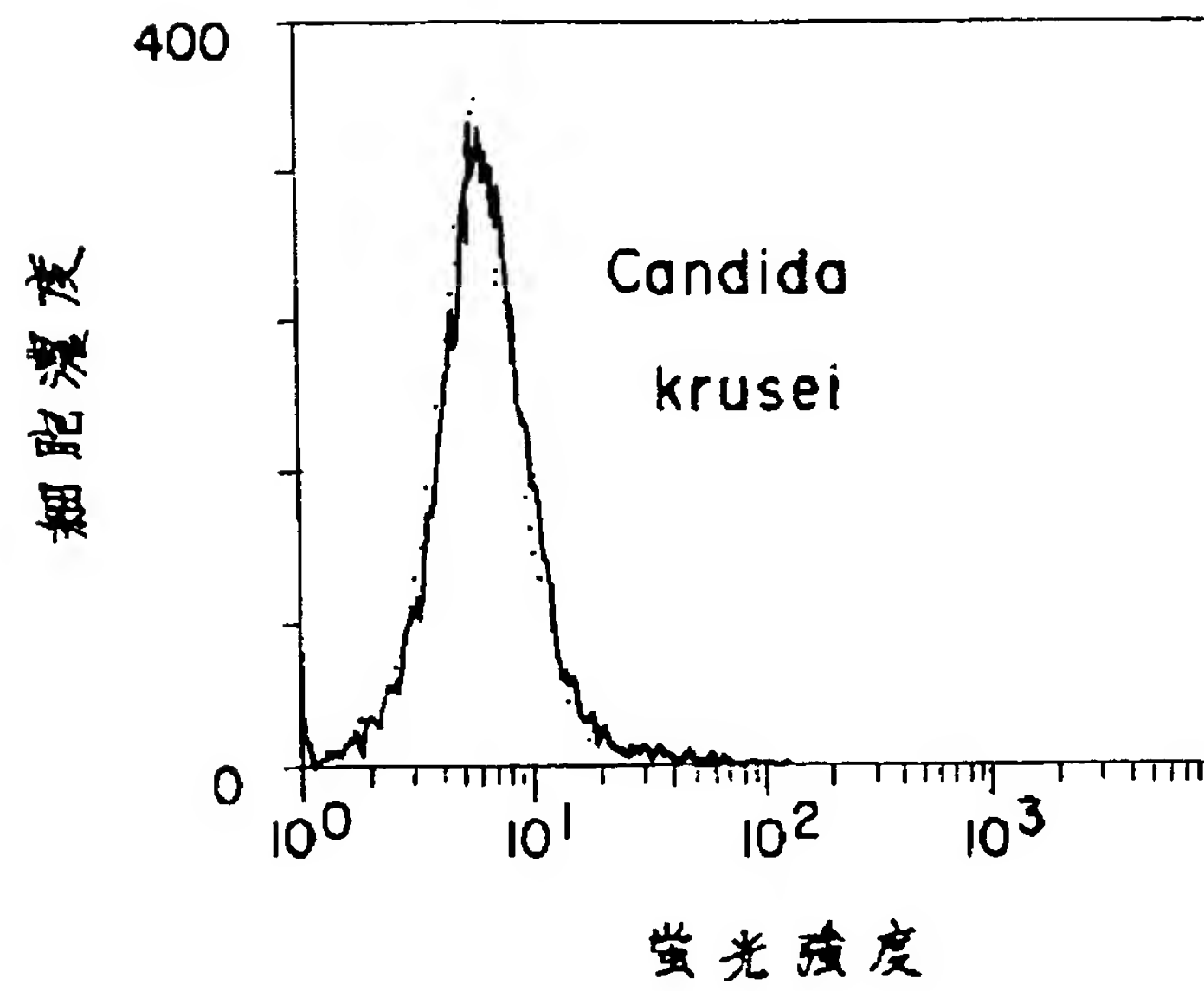
【図7】



【図8】

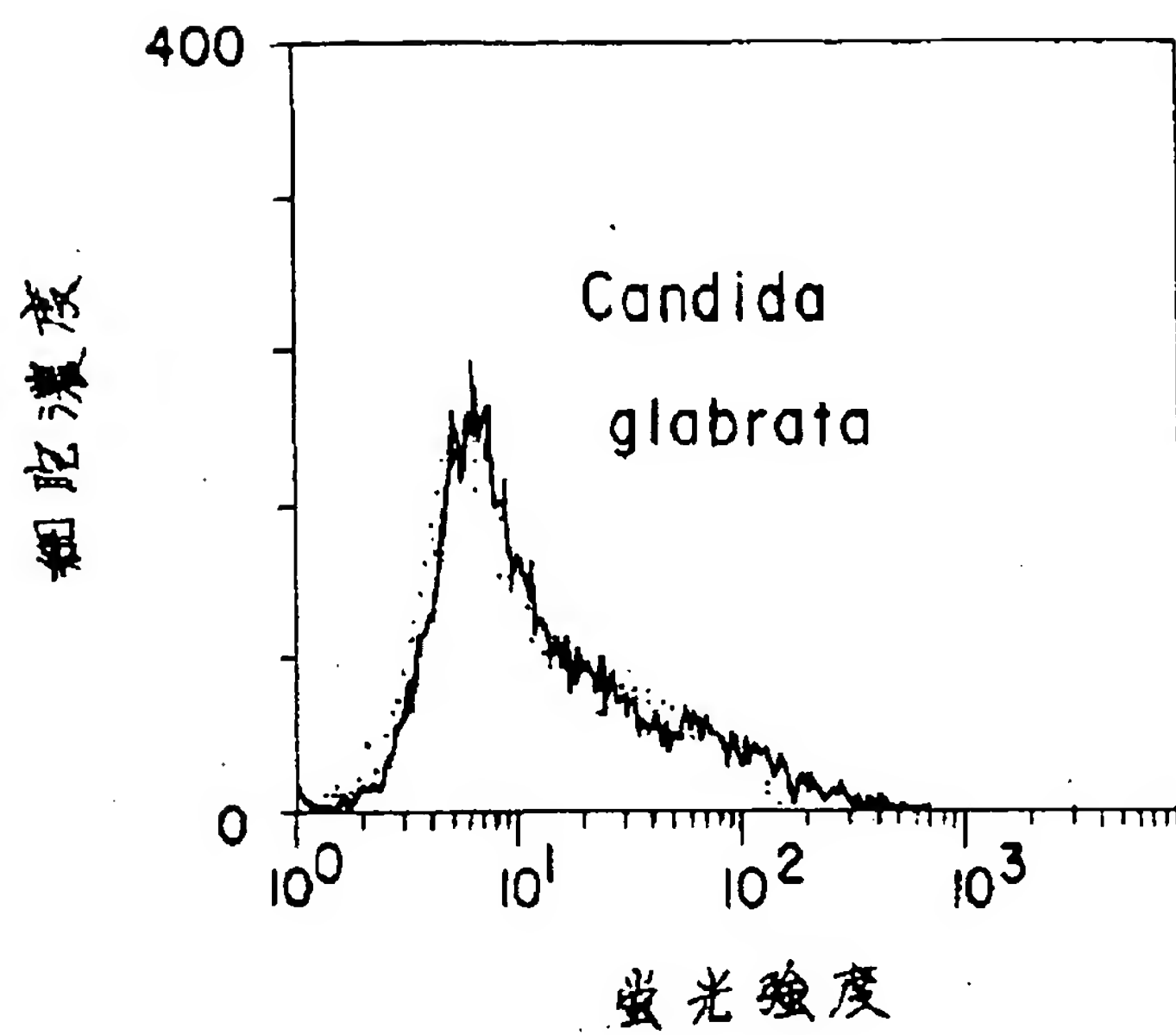


【図9】

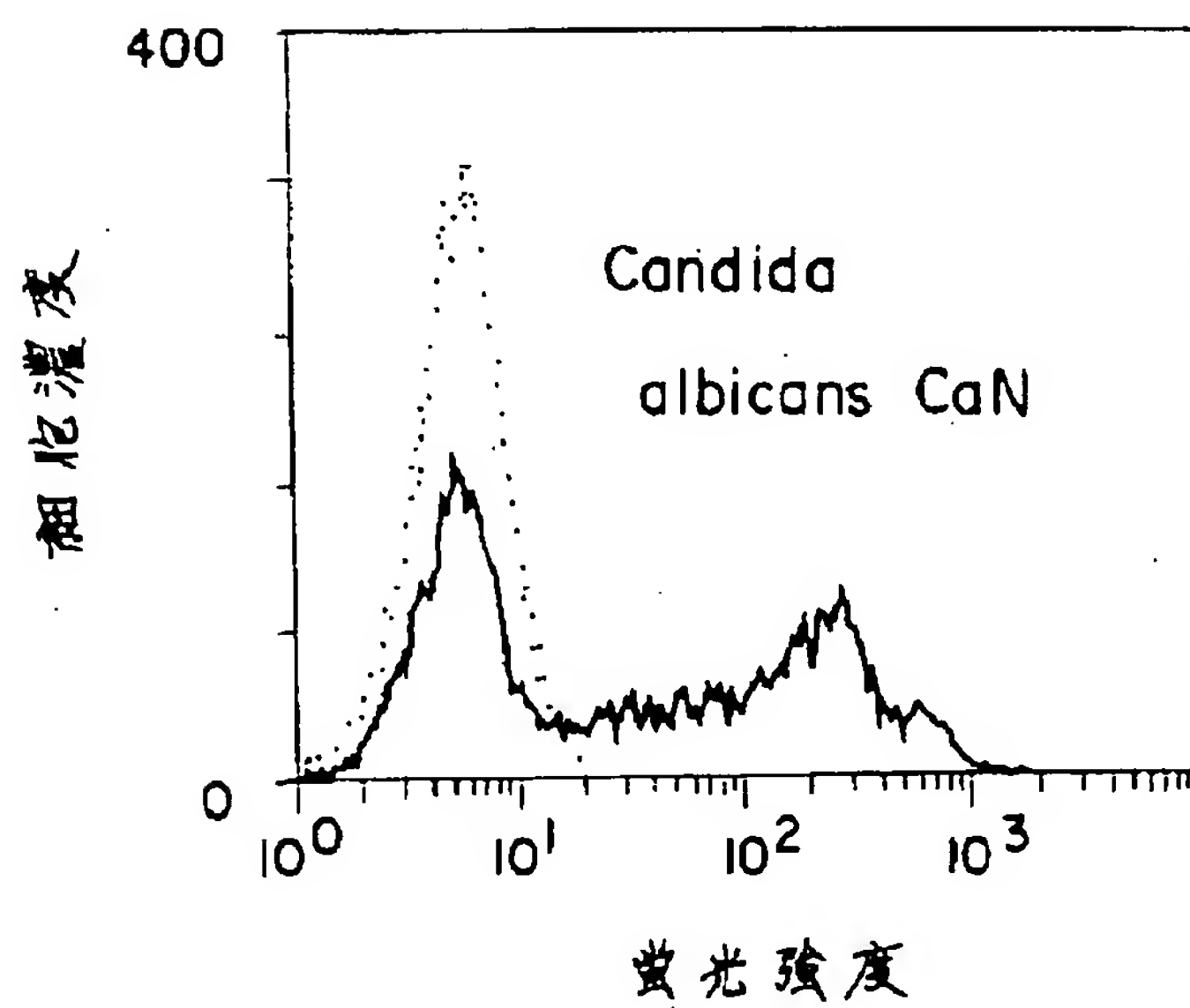




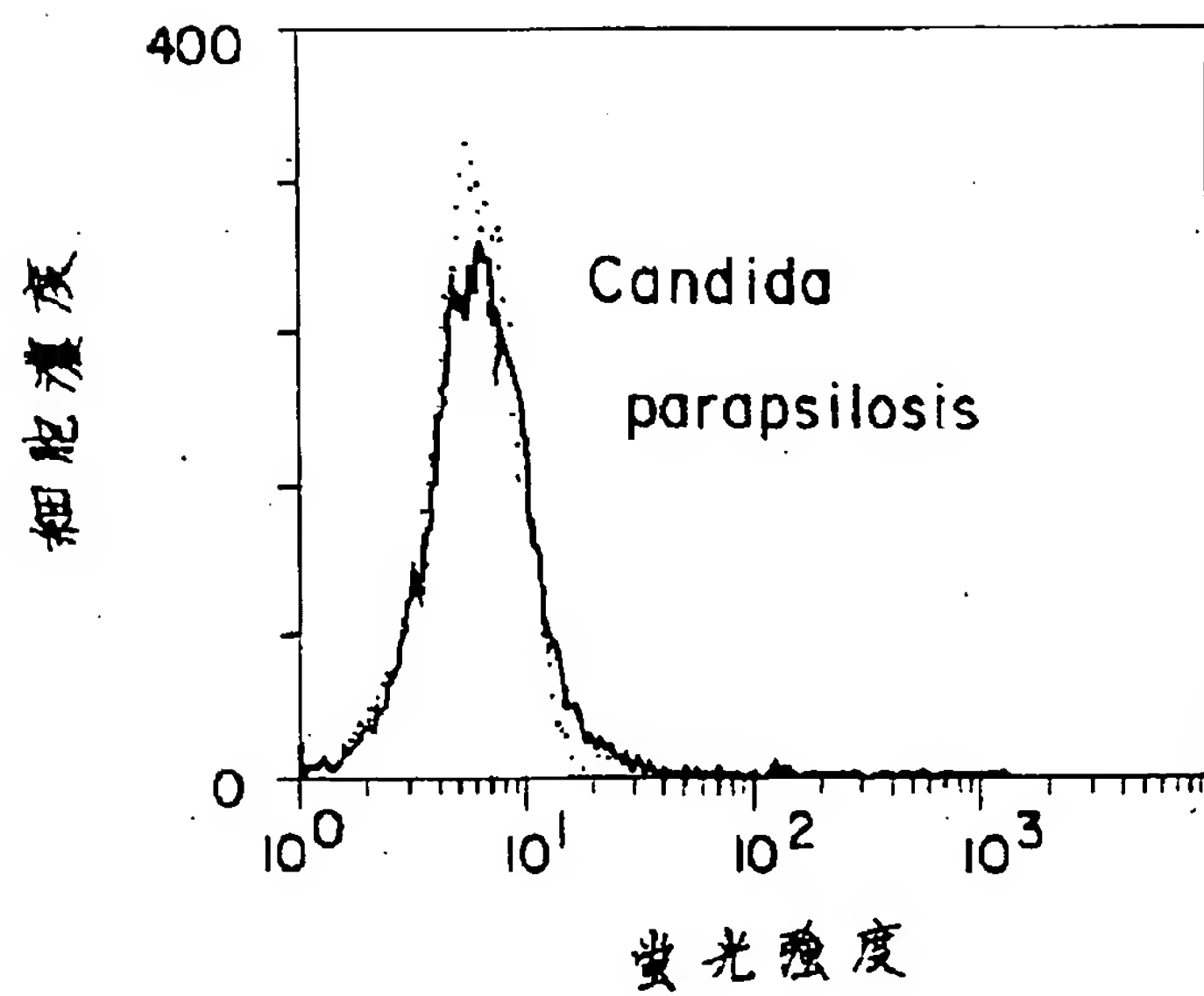
【図10】



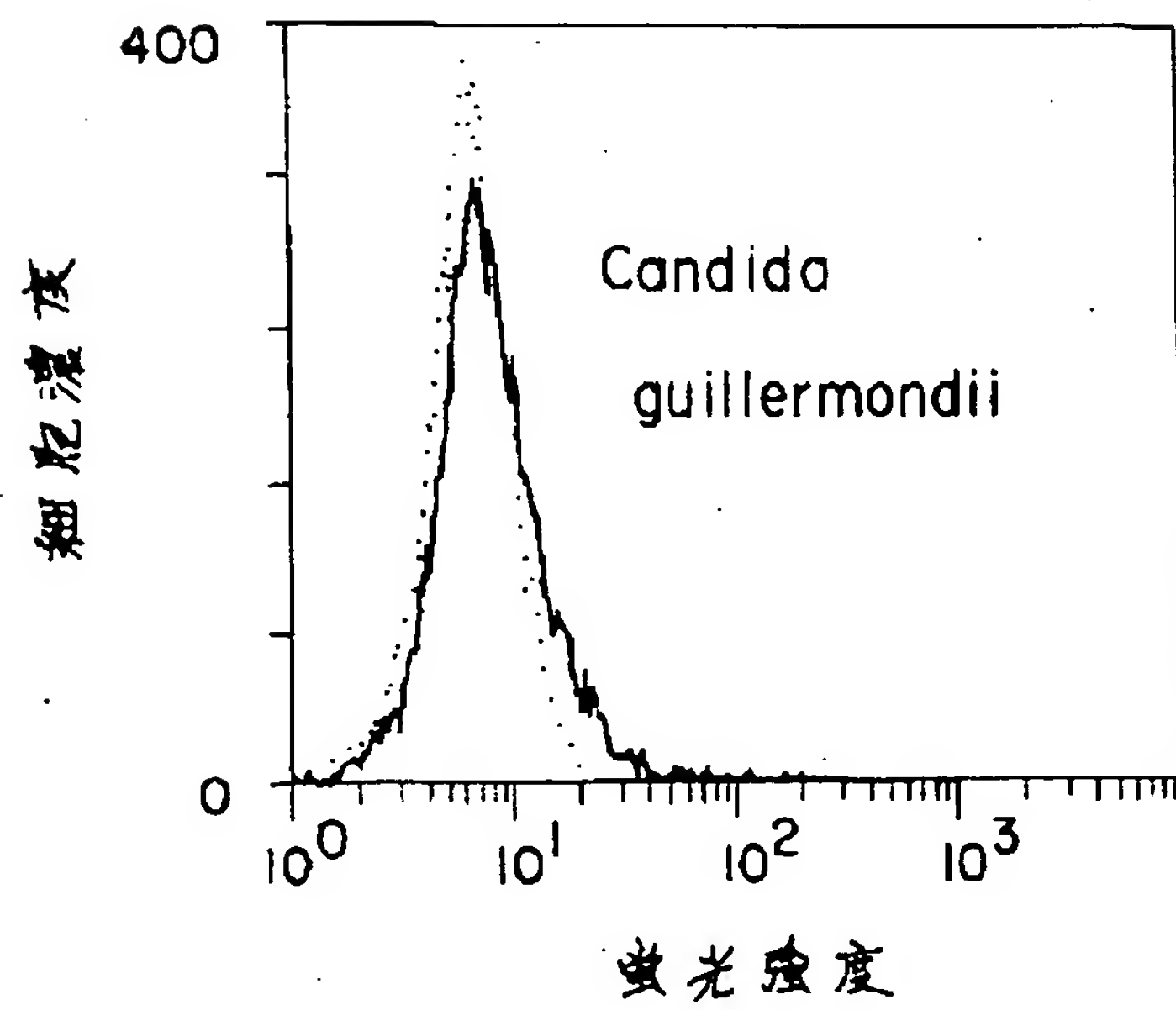
【図11】



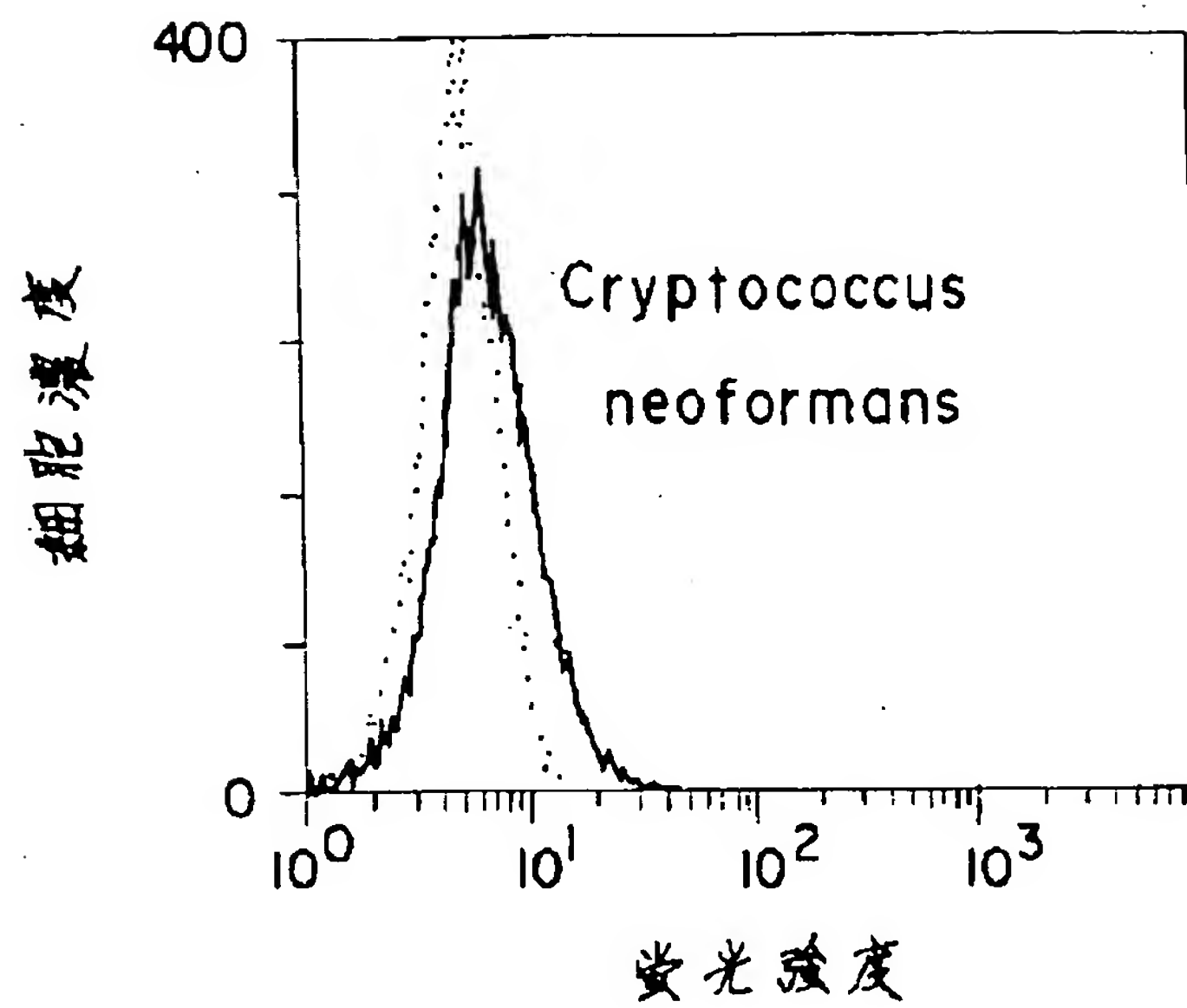
【図12】



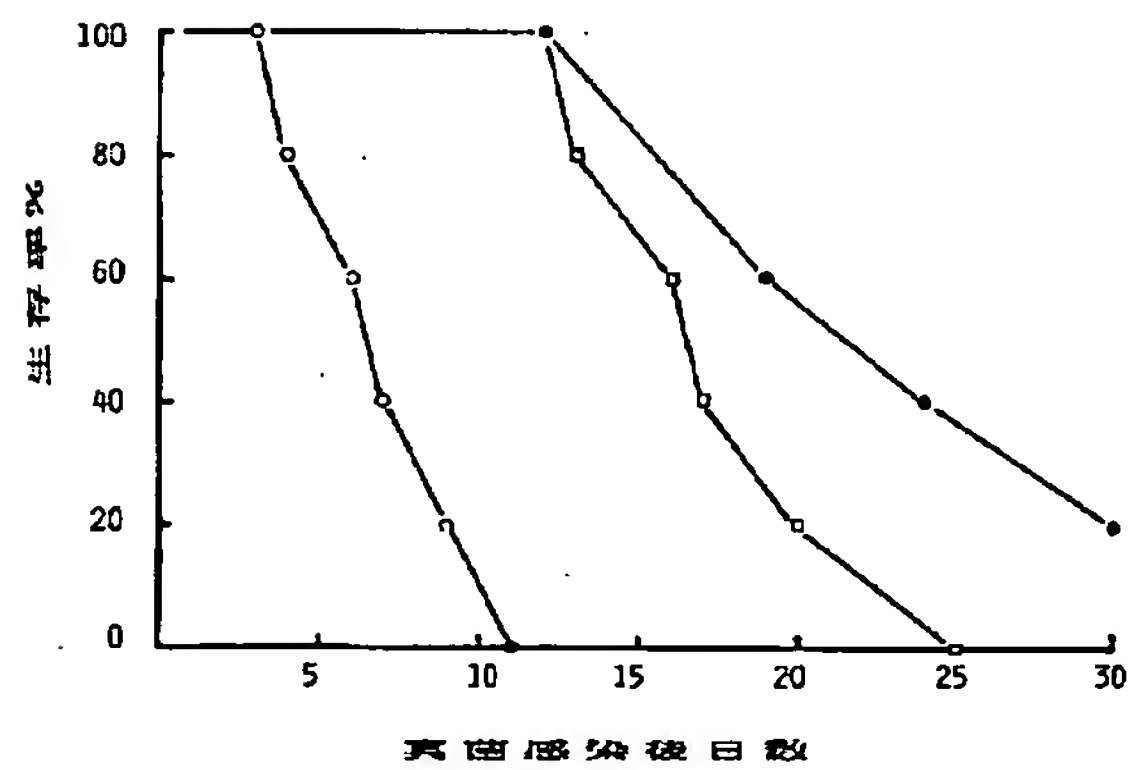
【図13】



【図14】



【図17】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>5</sup>

(C12P 21/08

C12R 1:91)

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所